

Strategien zur funktionellen MR-Bildgebung von experimentellen Gliomen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Diagnostische Radiologie/Schwerpunkt Neuroradiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. Claus Zimmer

geboren am 19.2.1958 in Kempfenhausen

Präsident: Prof. Dr. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Felix

Eingereicht am: 11.08.2000
Habilitiert am: 10.04.2001
Gutachter: 1. Prof. Dr. F. Zanella
2. Prof. Dr. K. Voigt

„ my brain may belong to neuroradiology,
but my heart definitely belongs to..... ”

I.	EINFÜHRUNG	8
1.1.	Gliome	8
1.2.	Konventionelle MR Bildgebung.....	13
1.2.1.	MR-Morphologie von Gliomen	13
1.2.2.	Gd-DTPA bei Gliomen	16
1.2.3.	Grenzen der konventionellen MRT	18
1.3.	Perfusions MRT	20
1.4.	Diffusions MRT.....	24
1.5.	Funktionelle MRT.....	25
1.6.	MR-Spektroskopie.....	27
1.7.	Nuklearmedizinische Untersuchungsverfahren (PET und SPECT)	31
1.8.	Xenon CT.....	34
II.	ZIEL DER ARBEIT	36
III.	EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	37
1.	Grundlagen	37
1. 1.	Einteilung und Wirkungsmechanismus von MR-Kontrastmitteln	37
1. 2.	Eisenoxide	39
1. 2. 1.	Allgemein	39
1. 2. 2.	Chemische Struktur von MION	41
1. 2. 3.	Pharmakologische Eigenschaften von MION	43
1. 2. 4.	Magnetische Eigenschaften von MION	43

2. Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke	44
2. 1. Fragestellung	44
2. 2. Material und Methoden	44
2. 2. 1. Modell	44
2. 2. 2. MR-Technik	45
2. 2. 3. Histologie	45
2. 2. 4. Autoradiographie	46
2. 2. 5. Bildanalyse	47
2. 3. Ergebnisse	48
2. 3. 1. Quantifizierung	48
2. 3. 2. Korrelation der MR-Bildgebung mit der Histologie	48
2. 3. 3. Auswirkung der Pulssequenz auf die Signalintensität	51
2. 3. 4. Zeitlicher Verlauf der Signalveränderungen und der Eisenoxidablagerungen	53
2. 3. 5. Vergleich der in vivo mit der ex vivo MR-Bildgebung	54
2. 4. Diskussion	54
3. MR-Bildgebung von experimentellen Gliomen	58
3. 1. Fragestellung	58
3. 2. Material und Methoden	58
3. 2. 1. Modell	58
3. 2. 2. MR-Technik	58
3. 2. 3. Histologie	59
3. 3. Ergebnisse	60
3. 3. 1. MR-Morphologie	60
3. 3. 2. Histologie	62
3. 4. Diskussion	66

4. In vitro Untersuchungen zur Eisenoxidaufnahme	73
4. 1. Fragestellung	73
4. 2. Material und Methoden	73
4. 2. 1. Zelllinien	73
4. 2. 2. Immunfluoreszenzmikroskopie	73
4. 2. 3. Quantifizierung der Kontrastmittelpagozytose	74
4. 3. Ergebnisse	75
4. 4. Diskussion	76
5. MR-Mikroskopie von experimentellen Gliomen	79
5. 1. Fragestellung	79
5. 2. Material und Methoden	79
5. 2. 1. Modell	79
5. 2. 2. MR-Technik	79
5. 2. 3. Histologie	80
5. 2. 4. Datenanalyse/Morphometrie	81
5. 3. Ergebnisse	81
5. 3. 1. MR-Morphologie	81
5. 3. 2. Histologie	83
5. 3. 3. Datenanalyse/Morphometrie	84
5. 4. Diskussion	85
6. Untersuchungen zur Blut-Hirn-Tumor-Schranke	88
6. 1. Fragestellung	88
6. 2. Material und Methoden	88
6. 2. 1. Modell	88
6. 2. 2. MR-Technik	89

6. 2. 3. Histologie	89
6. 3. Ergebnisse	90
6. 3. 1. MR-Morphologie	90
6. 3. 2. Histologie	90
6. 4. Diskussion	91

7. Untersuchungen zum Transferrin-Rezeptor Shuttle **94**

7. 1. Fragestellung	94
7. 2. Material und Methoden	94
7. 2. 1. Modell	94
7. 2. 2. Transferrin-Konjugation	94
7. 2. 3. MR-Technik, Bildanalyse	95
7. 2. 4. Histologie	96
7. 2. 5. ICP-AES	96
7. 3. Ergebnisse	97
7. 3. 1. Histologie	97
7. 3. 2. ICP-AES	100
7. 3. 3. MR-Bildgebung	101
7. 4. Diskussion	101

8. Untersuchungen zur Gliomangiogenese **105**

8. 1. Fragestellung	105
8. 2. Material und Methoden	105
8. 2. 1. Modell	105
8. 2. 2. MR-Technik, Kontrastmittel und Bildanalyse	105
8. 2. 3. Histologie	110
8. 3. Ergebnisse	112
8. 3. 1. MR-Bildgebung	112

8. 3. 2. Histologie	118
8. 4. Diskussion	121

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	126
---	------------

V. LITERATUR	133
---------------------	------------

VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	170
----------------------------------	------------

VII. DANKSAGUNG	178
------------------------	------------

I. EINFÜHRUNG

1. 1. Gliome

Gliome machen ungefähr 30-40% aller Hirntumore beim Erwachsenen aus (1). Die Inzidenz der Gliome beträgt bei den Männern 5-6/100000/Jahr, bei den Frauen 3-4/100000/Jahr, wobei sie mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt (19/100000/Jahr im 70.-80. Lebensjahr) (2, 3). Zu den Gliomen werden die Astrozytome, Glioblastome, Mischgliome (Oligoastrozytome), Oligodendrogliome, Ependymome und die Plexustumore gezählt. Mit dem Terminus „Gliom“ sind hier und im folgenden Gliome astrozytärer Differenzierung gemeint; Ependymome und Plexustumore nehmen, was die Tumorbilogie, die Therapie und die Morphologie und damit auch die Bildgebung angeht, eine Sonderstellung ein. Sie sind primär nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die Einteilung der Gliome erfolgt im deutschsprachigen Raum nach der 1993 revidierten WHO-Klassifikation der Hirntumoren (4), die in ihrer ersten Fassung auf Zülch zurückgeht (5). Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Klassifikationen, welche in anderen Ländern eine größere Rolle spielen. Erwähnt seien frühere Einteilungen nach Bailey und Cushing (6), nach Kernohan (7), nach Ringertz (8) sowie neuere Klassifikationen nach Daumas-Duport (9) und Burger (10). Fast alle Klassifikationen basieren auf einem histogenetischen Einteilungsprinzip, bei dem ein Tumor dem Zelltyp zugeordnet wird, aus dem er hervorgegangen ist. Allerdings bereitet diese Vorgehensweise histologisch dann Schwierigkeiten, wenn die Tumorzelle undifferenziert ist oder sich der Tumor aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Den meisten Klassifikationen liegt ein 3stufiges oder 4stufiges Grading zu Grunde, allerdings ist gerade dieses Grading immer wieder Gegenstand der Diskussion. So wird zum Beispiel vorgeschlagen, bei Erwachsenen nur zweistufig zwischen einem „low-“ und einem „high-grade“ Gliom zu unterscheiden (11). Allerdings zeigte die Deutsch-Österreichische maligne Gliomstudie, dass es einen hochsignifikanten Unterschied im Verlauf und in der Prognose zwischen dem Astrozytom WHO Grad III und dem Glioblastom WHO Grad IV gibt (12). Auch gibt es durchaus Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen verschiedenen Gliomentitäten mit demselben WHO Grad: So haben Oligodendrogliome (WHO Grad II) meist eine günstigere Prognose als Astrozytome mit dem entsprechenden Grading (13). Histopathologische Kriterien für das Grading von Gliomen sind das Vorhandensein von Kernatypie,

Mitose, Endothelproliferation und Nekrose. Ob es sich nach WHO um ein Grad II oder III Gliom handelt, hängt vom Vorhandensein von Mitosen ab; der Unterschied zwischen einem Grad III und einem Grad IV Gliom macht sich an dem Vorkommen von Gefäßproliferationen und/oder Nekrosen fest. Allerdings gibt es Abweichungen von dieser Regel. So weist das klassische pilozytische Astrozytom des Kindes- und jungen Erwachsenenalters, welches dem WHO Grad I entspricht, Merkmale auf, die im Erwachsenenalter als malignitätsverdächtig eingestuft werden: Dieser Tumor kann pathologische Gefäßproliferationen, eine Zell- und Kernpolymorphie und manchmal sogar Nekrosen aufweisen.

Gliome wachsen in der Regel diffus in das umgebende Hirnparenchym. Dabei erfolgt die Migration von Gliomzellen entlang von vorgegebenen, extrazelluläre-Matrix (ECM) – Protein-enhaltenden, anatomischen Strukturen wie den myelinisierten Bahnsystemen der weißen Substanz oder vaskulären und leptomeningealen Basalmembranen (14, 15). Die Potenz zur Invasion korreliert nicht mit dem Grad der Malignität. Auch niedrig-gradige Gliome (LGG) wachsen häufig diffus infiltrierend (16), sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ist die Grenze zum anliegenden Hirngewebe unscharf.

Neben der Gewebebeschaffenheit der extrazellulären Matrix wird die Gliominvasion zusätzlich auch durch eine enzymatische Beeinflussung des Extrazellulärspaces durch die Tumorzelle selbst begünstigt (15). Die Tumorzellinvasion vollzieht sich in drei Stufen: eine Rezeptor-vermittelte Adhäsion der Tumorzelle an Matrixproteinen, die Auflösung der Extrazellulärmatrix durch Metallproteinasen und die Reorganisation der zytoskelettalen Elemente (17). Inwieweit eine Zelle invasive Eigenschaften hat, wird nicht bestimmt durch ein einzelnes Gen oder Protein, sondern ist das Produkt eines Ungleichgewichtes in der Regulierung des existierenden physiologischen Zellprogrammes (18). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere Zytokine, Proteasen und Adhäsionsmoleküle wie CD44, transforming growth-factor- β 1, Matrix-Metallproteinase und Integrine von funktioneller Bedeutung bezüglich der Veränderungen der Extrazellulärmatrix sind (19, 20, 21, 22). In diesem Zusammenhang spielen sowohl Makrophagen aus dem Blut als auch die ortsständige Mikroglia eine wichtige Rolle. Letztere wird durch den Tumor selbst aktiviert und moduliert insbesondere die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen, denen eine Schlüsselrolle für die Tumordinvasion zugeschrieben wird. (23, 24). Speziell wird die physiologische,

kontrollierte Proteolyse in Richtung einer verstärkten Spaltung der Extrazellulärschranke beeinträchtigt. Gerade Mikrogliaaktivierung führt durch die Produktion spezifischer Signalmoleküle des Immunsystems wie z. B. Zytokinen (Interleukine 1-6, Interferone- α/β , - γ , Tumornekrosefaktor u.v.a.), sowie durch die Expression co-stimulierender Adhäsionsmoleküle (IMAC-1) zur Stimulation von peripheren T-Zellen. Diese passieren dann die Blut-Hirn-Schranke und infiltrieren in das Hirnparenchym (25).

Die diffuse Infiltration von verstreuten Tumorzellen in die Tumorumgebung stellt ein wesentliches Problem bei der chirurgischen Behandlung dieser Tumoren dar und ist zugleich der Hauptgrund dafür, dass Gliome nicht in toto chirurgisch entfernt werden können. Von den verstreuten, infiltrierenden Tumorzellen geht nach radikaler Tumorexstirpation das neue Tumorwachstum aus. Ohne raumfordernde Wirkung zu haben, können solche singulären Tumorzellen bereits zu neurologischen Ausfällen führen, wobei der Mechanismus dafür bislang noch unklar ist (26).

Bei der Entstehung und Malignisierung von Gliomen wird der Tumorangiogenese eine wichtige Bedeutung zugerechnet (27). Endothelzellproliferation ist ein Charakteristikum von malignen Gliomen und fehlt bei niedrig-gradigen Tumoren dieser Gruppe. Das Glioblastom als die bösartigste Gliomform ist ein hoch vaskularisierter Tumor, der als histologisches Merkmal typische mikrovaskuläre Proliferationen zeigt. Die Bedeutung sowohl der Gefäßdichte als auch der Gefäßqualität findet nicht zuletzt auch darin ihren Ausdruck, dass diese Parameter wichtige Komponenten der meisten histologischen Grading Systeme für Gliome sind. Obwohl manche Glioblastome „de novo“ entstehen, gehen ein Großteil dieser Tumoren aus primär niedrig-gradigen Gliomen hervor. Schon früh wurde erkannt, dass Angiogenese und die Fähigkeit, Blutgefäße aus der Tumorumgebung zu rekrutieren, ein bedeutender Faktor für den Übergang von benignen zu malignen Gliomen ist (28). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass sich diese zwei Glioblastomtypen molekulargenetisch voneinander unterscheiden, wobei bei den de-novo-Glioblastomen das p53-Tumorsuppressorgen meist intakt und das EGFR-Onkogen aktiviert ist. Demgegenüber zeigen sich aus einem niedrig-gradigen Astrozytom entwickelnde, sog. sekundär maligne Gliome, häufig ein mutiertes p53-Tumorsuppressorgen (29). Auch das Tumorwachstum und die Invasion des Tumors in das benachbarte Gewebe sind Angiogenese-abhängig. Ohne die Penetration von Blutgefäßen können die Tumoren nur bis zu einer Größe von 1-2 mm wachsen,

die Energiezufuhr erfolgt dann durch Diffusion (30). Die Stimulation von neuen, den Tumor versorgenden Kapillaren (Angiogenese) ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Es zeichnet sich jedoch ab, dass sowohl genetische Transformation als auch bestimmte äußere „Stress-Bedingungen“ in der Tumorumgebung (z.B. Hypoxie) eine Rolle spielen (31). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese selbst aus einer Störung des Gleichgewichtes zwischen sie stimulierenden und hemmenden Faktoren resultiert (30). Sowohl die Überexpression von Angiogenesestimulatoren und ihren entsprechenden Signaltransduktoren als auch der Verlust von Angiogeneseinhibitoren führen zu einer gesteigerten Tumorangiogenese. Solche Angiogeneseinhibitoren sind im normalen Gewebe vorhanden und führen physiologisch zu einer Suppression von pathologischem Endothelzellwachstum. Man weiß mittlerweile, dass Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 zum Aktivitätsverlust eines solchen Angiogeneseinhibitors bei Gliomen führen können (32). Es ist eine große Zahl an angiogenetischen Wachstumsfaktoren bekannt, die bei Tumoren konstant überexprimiert werden (33). Die wichtigsten und am besten charakterisierten sind der vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF, VPF), der platelet-derived growth factor (PDGF) und der acidic/basic fibroblast growth factor (FGF-1 und FGF-2) (34).

Die Therapie der Gliome stützt sich z. Zt. vorwiegend auf chirurgische, chemotherapeutische und radiotherapeutische Strategien, wobei auf entsprechende Übersichtsarbeiten verwiesen wird (35, 36, 37, 38). Während bei LGG durch entsprechende Therapieansätze eine deutliche Prognoseverbesserung erzielt werden kann, ist die Prognose bei malignen Gliomen (HGG) mit einer mittleren Überlebenszeit von wenigen Monaten nach wie vor infaust. Obwohl das therapeutische Vorgehen bei malignen Gliomen nicht einheitlich ist, wird jedoch meist zunächst eine möglichst radikale Tumorentfernung zur Beseitigung der Raumforderung, Reduktion der Tumormasse und Gewinnung von aussagekräftigem Histologiematerial angestrebt (39). Inwieweit die Radikalität der Resektion mit der tatsächlichen Überlebenszeit korreliert, wird widersprüchlich angesehen, wobei von der Mehrheit der Autoren jedoch eine Korrelation zwischen dem Ausmaß an entferntem Tumorgewebe und der mittleren Überlebenszeit beschrieben wird (40, 41). Allerdings gibt es auch Studien, die beim Glioblastom keinen Überlebensvorteil von zytoreduktiv operierten gegenüber ausschließlich biopsierten Patienten herausarbeiten konnten (42). Die Tumorentfernung erfolgt heut-

zutage unter möglicher Schonung von funktionell wichtigen Hirnarealen, wobei sich immer mehr EDV-gestützte Verfahren der Neuronavigation durchsetzen. Üblicherweise werden HGG im Anschluss an die Operation nachbestrahlt, dabei kommen verschiedene Formen der Bestrahlung zum Einsatz. Bei diesen neuen Verfahren der Radiochirurgie (interstitielle oder perkutane stereotaktische Bestrahlung) wird mit Submillimeterpräzision die Strahlendosis in das Tumervolumen appliziert, wobei das angrenzende Hirngewebe geschont wird. Dies ermöglicht u.a. wesentlich höhere Strahlendosen direkt auf das Tumorgewebe. Darüber hinaus wird in zahlreichen Zentren eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt, ohne dass deren Wert, insbesondere beim Glioblastom bisher überzeugend belegt wäre (38). Auch wird die Wirksamkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie vor der Strahlentherapie evaluiert (43, 44)

Die angesprochenen Therapiestrategien bewirken bei malignen Gliomen eine mittlere Überlebenszeit nach alleiniger neurochirurgischer Resektion von 20 Wochen, nach Resektion mit anschließender Strahlentherapie von 36 Wochen. Eine zusätzlich durchgeführte Chemotherapie kann die Überlebenszeit um wenige weitere Wochen verlängern. Demgegenüber wird die mittlere Überlebenszeit ohne jegliche Therapie mit 14 Wochen angegeben (45, 46, 47). Eine Ausnahmestellung bzgl. der Chemotherapiesensibilität besteht bei den Oligodendrogliomen und Mischgliomen (Astrozytome mit oligodendroglialem Anteil). Diese Tumoren zeichnen sich hinsichtlich des Ansprechens auf Chemotherapie durch eine wesentlich günstigere Situation aus, wobei Remissionsraten von bis zu 75 % (komplette Remission 38%) beschrieben sind (48). Über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verlust der Heterozygotie eines Chromosoms (1p) und der Chemosensibilität von oligodendroglialen Tumoren wird berichtet (49). Neben der angesprochenen Tatsache, dass bestimmte Unterformen der Gliome die Prognose des Patienten deutlich verbessern, haben insbesondere ein niedriges Alter des Patienten, ein niedriger Karnofsky-Index (Beurteilungsinstrument zur Beschreibung der Lebensqualität), das Fehlen von neurologischen Defiziten und eine längere symptomatische Vorgeschichte einen lebensverlängernden Effekt. Ein besserer Krankheitsverlauf ist dann zu erwarten, wenn der Patient ein niedriges histologisches Grading hat, er jung ist, einen guten Karnofsky-Index (>70%) besitzt, wenige neurologische Defizite und eine längere symptomatische Krankheitsvorgeschichte aufweist (50).

Eine Reihe von Therapieformen sind bei Gliomen mit großen Hoffnungen verbunden, befinden sich z. Zt. aber noch im Experimentalstadium (51). Im wesentlichen umfassen diese Therapie-strategien den Einsatz von neuen Chemotherapeutika, aber auch die Entwicklung von Strategien, mit denen die BHS überwunden werden kann und höhere Pharmakadosen in den Tumor gebracht werden können (intrathekale vs. intraarterielle vs. lokale Chemotherapie; artifiziell pharmakologi-sche Öffnung der BHS vor Chemotherapiegabe u. a.). Ein Ansatzpunkt für eine erfolgverspre-chende Therapie ist die Tumorangiogenese. So führte u.a. die Charakterisierung einer mittlerwei-le großen Anzahl von angiogenetischen Wachstumsfaktoren in den letzten Jahren fast parallel zur Entwicklung von einer Reihe von antiangiogenetischen Therapiekonzepten. Der theoretische Hin-tergrund für eine antiangiogenetische Therapie begründet sich darin, dass die Bildung von neuen Tumorgefäßen eingeschränkt oder blockiert werden soll, um damit eine Abschwächung oder so-gar Blockierung der Angiogenese zu bewirken. Für eine antiangiogenetische Therapie bieten sich Gliome insofern besonders an, da sie zu den bestvaskularisierten menschlichen Tumoren über-haupt zählen. Mehrere Studien belegen mittlerweile eine erfolgreiche antiangiogenetische Tumor-therapie bei Gliomen, meist in vitro oder tierexperimentell in vivo (52, 53, 54).

Andere, meist auch eher noch experimentelle Therapieansätze stützen sich auf die Gentherapie, Immuntherapie, Bor-Neutroneneinfang-Therapie, Photodynamische Therapie (unter Benutzung von Porphyrinen als „Photosensitizer“) oder die Hyperthermie. Allerdings befinden sich einige von ihnen mittlerweile schon in präklinischer oder klinischer Erprobung (51, 55, 56, 57).

Insgesamt bieten die angedeuteten neuen Entwicklungen auf dem Gebiet der Mikrochirurgie, der Strahlentherapie, der Pharmakotherapie aber auch der Gentherapie von Gliomen Anlass zur Hoff-nung, trotz der nach wie vor infausten Prognose insbesondere der HGG. Neue Therapieansätze erfordern eine weiterentwickelte Bildgebung dieser Tumoren, nicht nur in der Frühphase der dia-gnostischen Therapieplanung sondern auch im Rahmen des Monitoring des Therapieerfolges.

1. 2. Konventionelle MR-Bildgebung

1.2.1. MR-Morphologie von Gliomen

Als 1972 auf einer Pressekonferenz der Firma EMI erstmals Untersuchungsergebnisse mit der von Godfrey Newbold Hounsfield entwickelten Computertomographie vorgestellt wurden, war eine neue Ära in der Diagnostik intrakranieller Raumforderungen angebrochen. Erstmals war es da-

durch möglich geworden, Hirngeschwülste in vivo direkt bildhaft darzustellen, während sich diese mit den zuvor angewandten Methoden wie Ventrikulographie, Echoenzephalographie oder zerebraler Angiographie nur indirekt erfassen ließen.

Die später eingeführte magnetische Resonanztomographie (MRT) nutzte ein anderes physikalisches Messverfahren als die Computertomographie und erbrachte, neben der Möglichkeit der multiplanaren Abbildung einer Raumforderung in allen 3 Ebenen, im wesentlichen eine bessere Gewebedifferenzierung durch bessere Weichteilkontraste. Mit der CT, insbesondere aber der MRT, war realisiert worden, Gliome z.T. auch schon in einem frühen Stadium mit einer hohen Präzision zu erfassen. Insbesondere konnte der Tumor jetzt genau lokalisiert und in Beziehung zu den umliegenden anatomischen Strukturen gesetzt werden. Radiologische Beurteilungskriterien, wie die genaue Lagebeziehung des Tumors, die Gewebequalität und die Reaktion des benachbarten Hirnparenchyms, erlauben in der Synopsis mit wichtigen klinischen Zusatzinformationen (Erkrankungsalter, Dauer der klinischen Symptomatik, Geschlecht, eventueller Primärtumor) eine differentialdiagnostische Einordnung.

In der MRT führen Gliome typischerweise zu einer Verlängerung der T1 und der T2 Relaxationszeit und erscheinen so hypointens in T1-gewichteten, hyperintens in T2-gewichteten und meist ganz gering hyperintens in Protonen-Dichte (PD)-gewichteten Sequenzen (Abb. 1).

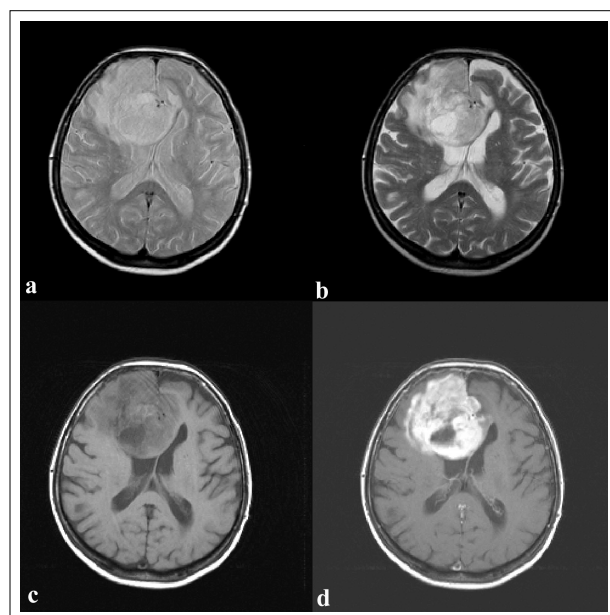


Abb. 1: Glioblastom re. frontal
PDw (a), T2w (b), T1w Präkontrast (c) und T1w nach Gd-DTPA-Gabe (d).

Diese Signalveränderungen werden hauptsächlich durch vermehrte Gewebsflüssigkeit im Tumorgewebe verursacht, in geringerem Maße durch vermehrtes zelluläres Volumen. Sekundäre Veränderungen innerhalb des Glioms wie Blutungen, Zysten, Verkalkungen oder Nekrosen verändern das kernspintomographische Erscheinungsbild im Sinne einer vermehrten Heterogenität des Tumors. So verändern Tumoreinblutungen, wie sie beim Glioblastom nicht selten vorkommen, das Erscheinungsbild insbesondere in T1-gewichteten Sequenzen, indem dann vermehrt hyperintense Areale innerhalb des Tumors zu finden sind. Hypointense Signalveränderungen in T2-gewichteten Sequenzen andererseits weisen u.a. auf Verkalkungen hin. Spezielle zusätzliche Sequenzen wie "Inversion-Recovery-Verfahren" (FLAIR, TIRM) oder CISS-Sequenzen tragen im allgemeinen wenig zur weiteren Charakterisierung der Gliome bei, wenngleich sie im Einzelfall zur Klärung von morphologischen Details hilfreich sein können. FLAIR-Sequenzen in Kombination mit KM-Gabe können den Kontrast zwischen Tumor und Hirngewebe verstärken, ein ähnlicher Effekt wird durch die Anwendung von „Magnetization-Transfer“- (MT)-Technik erreicht (58). Auch MR-angiographische Methoden (TOF oder PC) geben kaum Zusatzinformationen: Sie ermöglichen zwar die Darstellung der großen zu- oder abführenden Gefäße, eine Darstellung oder gar Quantifizierung der Tumor-Mikrogefäße erlauben sie nicht (59).

Neben der konventionellen präoperativen MRT wird in neuerer Zeit auch ein intraoperatives MR-Monitoring in offenen MR-Scannern durchgeführt (60, 61). Diese Methoden ermöglichen dem Operateur intraoperativ, insbesondere die Radikalität seines Vorgehens zu überprüfen und zumindest den Kontrastmittel (KM)-anreichernden Tumoranteil, soweit es die Tumorlokalisation erlaubt, unter direkter, annähernd simultaner MR-Kontrolle komplett zu entfernen. Darüber hinaus stellt die intraoperative MR-Bildgebung eine Möglichkeit dar, die Neuronavigation zu verbessern, da die durch die Operation selbst herbeigeführten Veränderungen des Operationssitus (z. B. Hirnschwellung) direkt visualisiert werden können, ohne auf präoperative Aufnahmen, welche eine meist zum intraoperativen Situs abweichende Morphologie aufweisen, angewiesen zu sein. Insbesondere die operativ bedingte Manipulation der BHS zieht, im Vergleich zu den präoperativen Aufnahmen, sowohl wesentliche Änderungen im KM-Anreicherungsverhalten als auch im Flüssigkeitsgehalt des Hirnparenchyms nach sich.

1.2.2. Gd-DTPA bei Gliomen

Zusätzliche Informationen über das Gliom werden über die i.v. Gabe von KM gewonnen, wobei insbesondere der Kontrast zwischen Tumorgewebe einerseits und normalem Hirngewebe andererseits deutlich verstärkt wird. In der klinischen Routinediagnostik von Gliomen wird nach wie vor Gd-DTPA (Magnevist®, Omniscan®, ProHance® u. a.) verwandt. Durch dieses KM wird hauptsächlich der Kontrast zwischen Tumorgewebe einerseits und normalem Hirngewebe andererseits deutlich verstärkt. Nach wie vor gilt als grobe Regel, dass Gliome um so mehr Gd-DTPA anreichern, je maligner sie sind. Allerdings ist diese Regel nicht zuverlässig und für das pilozytische Astrozytom nicht gültig (s. 1.2.3.). Der Hauptgrund für die stärkere KM-Anreicherung bei malignen Gliomen ist darin begründet, dass bei HGG die Permeabilität der Gefäße gestört ist. Die erhöhte Vaskularisation bei den HGG spielt in diesem Zusammenhang eher eine untergeordnete Rolle. Neben der besseren Abgrenzbarkeit eines Teiles des Tumors und gewissen Hinweisen bezüglich seiner Malignität ermöglicht das KM-Anreicherungsmuster auch, Gliome gegenüber anderen Raumforderungen innerhalb des Gehirns (andere Tumore z.B. Metastasen oder Abszesse) abzugrenzen. So stellt sich die Kapsel eines Abszesses – ähnlich dem Glioblastom - zwar auch als eine deutlich KM-anreichernde Rundstruktur dar, sie ist jedoch in der Regel dünner und gleichmäßiger konfiguriert als die Randzone eines Glioblastoms. Dennoch kann im Einzelfall die Differentialdiagnose zwischen diesen beiden Pathologien schwierig sein. Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch, dass es sich bei Gd-DTPA um ein extrazelluläres Kontrastmittel handelt, welches intravenös gespritzt wird und sich dann im Zellinterstitium in Regionen mit gestörter BHS anreichert. Dieses KM hat keinerlei zelluläre Spezifität. Es spiegelt somit im wesentlichen die sekundäre Störung der BHS wider, welche zwar mit dem Gliom in Zusammenhang steht, jedoch nicht unmittelbar mit der Tumorausbreitung gleichzusetzen ist (s. 1.2.3.).

Der Mechanismus der Kontrastmittelablagerung im Zellinterstitium ist dabei komplex und bislang nicht systematisch untersucht. Nach intravenöser Kontrastmittelgabe gelangt das Kontrastmittel über die Blutbahn in den Tumor. Inwieweit es den Tumor erreicht, ist u.a. auch davon abhängig, wie stark der Tumor vaskularisiert ist. Ob das Kontrastmittel anschließend die Gefäße verlässt, hängt vom Zustand der Blut-Hirn-Schranke/Blut-Hirn-Tumor-Schranke ab. Dabei ist bekannt, dass die Schrankenstörung bei Gliomen sehr heterogen ist. Innerhalb eines Glioblastoms gibt es z.B.

Areale mit noch intakter Blut-Hirn-Schranke, während andere Areale bereits gestört sind. Inwieweit das Kontrastmittel die Gefäße verlässt und in das Interstitium diffundiert, hängt im wesentlichen auch von der Größe des Kontrastmittels ab; je kleinmolekularer das Kontrastmittel, um so leichter überwindet es die BHS. Daneben dürften aber zahlreiche andere Faktoren bei der letztendlichen Ablagerung des KM im Gewebe eine Rolle spielen, denen bislang, auch bei der Beurteilung der Kontrastierung von Gliomen, allerdings zu wenig Beachtung geschenkt worden ist. Hier kann hauptsächlich auf die Arbeiten von Jain und Mitarbeitern zurückgegriffen werden, die sich mit dem Antransport von intravenös oder intraarteriell applizierten Makromolekülen in Tumoren zu therapeutischen Zwecken (u. a. Applikation von Chemotherapeutika) beschäftigt haben, deren Ergebnisse aber auch auf diagnostische Pharmaka wie MR-Kontrastmittel übertragbar sind (62, 63, 64, 65). Deren Untersuchungen zeigten, dass bei der Diffusion von Pharmaka in Tumoren der hydrostatische Druck innerhalb der Blutgefäße im Vergleich zum hydrostatischen Druck in der Gefäßumgebung eine wesentliche Rolle spielt. Zur Diffusion in das Interstitium ist ein Druckgefälle notwendig, d. h. der intravaskuläre Druck sollte größer sein als der Druck außerhalb der Gefäße. Es ließ sich zeigen, dass es in Tumoren Regionen mit einem sehr hohen interstitiellen Druck gibt, der verhindert, dass solche Makromoleküle in das Zellinterstitium diffundieren („Druckbarriere“). Während die meisten dieser Untersuchungen tierexperimenteller Art sind, gibt es nur wenige Untersuchungen an humanen Tumoren, die jedoch zu ähnlichen Ergebnissen kommen (66, 67). Die höchsten interstitiellen Druckwerte ließen sich in der Tumorperipherie gegenüber dem Tumorzentrum messen, was zu einer *zentripetalen* Konvektion der Pharmaka führt. Von Bedeutung sind diese Untersuchungen auch im Zusammenhang mit der erhöhten Vaskularisation im Rahmen der Tumorangiogenese. Es werden vermehrt über die Tumorgefäße Pharmaka in den Tumor transportiert, die auf Grund fehlender venöser Drainage zunächst nicht abtransportiert werden können, die aber dann, bedingt durch den angesprochenen Druckgradienten von der Peripherie in das Tumorzentrum gelangen. Von radiologischem Interesse sind in diesem Zusammenhang erste Beobachtungen von Taupitz und Mitarbeitern, die bei verschiedenen Tumoren (u.a. Lebertumoren) in MRT-Spätuntersuchungen (20 Minuten nach i.v. Kontrastmittelinjektion) einen zunehmend breiten hypointensen Saum in der äußeren Tumorzone beobachteten, während zentrale Tumorateile hyperintens blieben (68, 69). Dieses Phänomen wurde bisher nur außerhalb des Gehirns beschrieben und als „peripheral washout“-Phänomen bezeichnet (68, 69). Vergleichbare

Mechanismen sollten jedoch auch im Gehirn eine Rolle spielen und die Kontrastierung ebenfalls von Gliomen beeinflussen. Untersuchungen dazu gibt es jedoch nicht. Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Kontrastmittelablagerung und die Weiterdiffusion im Zellinterstitium haben dürften, sind der interstitielle pH sowie der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) innerhalb des Tumors und im Bereich der Tumorumgebung (70).

1.2.3. Grenzen der konventionellen MRT

Trotz großem Fortschritt, insbesondere durch die Einführung der MRT, sind einige Aspekte in der Gliomdiagnostik noch nicht zufriedenstellend gelöst.

Problematisch ist nach wie vor die genaue MR-Darstellung der *Gliomrandzone*. Kernspintomographisch besteht ein Gliom aus zwei Fraktionen: der Tumormasse, welche in der MRT meist durch den KM-anreichernden Teil repräsentiert wird, und dem infiltrierenden Tumoranteil, der sich bisher nicht visualisieren lässt. Obwohl dieser infiltrierende Tumoranteil zur Zeit nicht therapierbar ist, ist eine genau Visualisierung dieses Tumoranteiles anzustreben: bei der Bestrahlungsplanung von Gliomen ist die Bestimmung der Größenausdehnung dieses Areal von Bedeutung, um nicht gesunde Hirnareale unnötig mitzubestrahlen; im Rahmen von funktionellen MR-Untersuchungen ist die genaue Tumordemarkation von Interesse mit der Frage, inwieweit der Tumor in funktionell wichtige Hirnareale hinein wächst; auch bei neuen vielversprechenden Therapieformen (wie zum Beispiel Immuntherapie, Gentherapie und antiangiogenetische Therapie) ist diese Tumorregion von außerordentlicher Bedeutung. Hier gilt es, gerade die infiltrierenden Zellen in ihrem Wachstum zu hemmen, da von ihnen das neue Tumorstadium ausgeht. Auch in diesem Zusammenhang wäre eine Sichtbarmachung dieser Tumorfusionszone von Bedeutung. Konventionelle MR-Untersuchungen tragen wenig zur Gliomdemarkation bei: Anhand von T2-gewichteten MR-Aufnahmen wird die eigentliche Tumorausbreitung meist unterschätzt (71, 72). Umfangreiche histologisch-kernspintomographische Korrelationen zeigten, dass nach Gd-DTPA-Gabe die eigentliche Tumorgrenze sowohl innerhalb, meist jedoch außerhalb der kontrastmittelmarkierten Region liegen kann (73). Auch erhöhte KM-Dosen, wie immer wieder vorgeschlagen (74, 75) helfen, bei der Definition des exakten Tumorrandes nicht sicher weiter, sie führen hauptsächlich zu einer Verstärkung des Kontrastes zwischen der Haupttumormasse und

dem umgebenden Hirngewebe. Letztlich lassen sich mit der MRT Masseneffekt, Ödem und mit dem Tumor assoziierte Veränderungen darstellen, nicht jedoch die Tumorzellen selbst.

Ein weiteres Problem bei der gegenwärtigen MR-Bildgebung stellt die Tatsache dar, dass nach wie vor eine genaue *Artdiagnose* der Gliome in vivo nicht möglich ist. Obwohl wünschenswert, da mit therapeutischen Konsequenzen verbunden, ist z.B. eine Unterscheidung zwischen einem Astrozytom und einem Oligodendrogliom nicht-invasiv derzeit nicht möglich. Obwohl z.B. Verkalkungen in der Regel als ein Hinweis für ein Oligodendrogliom gewertet werden, kann diese Diagnose letztlich nur über eine bioptische Gewebegewinnung sicher gestellt werden. Die Spezifität der MRT ist diesbezüglich gering. Dies lässt sich in gleicher Weise auf die fehlende sichere Abgrenzung von Gliomen von anderen entzündlichen (z.B. Abszessen) oder neoplastischen intrazerebralen RF (z.B. Metastasen) übertragen.

Ähnliches gilt für das *Gliomgrading*. Obwohl es gewisse radiologische Kriterien gibt, die eher für ein malignes Gliom sprechen (unscharfer Tumorrand, Wachstum über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre, Tumornekrose, erniedrigtes T2-Signal als Hinweis für eine erhöhte Zelldichte und Pleomorphie), so ist eine Aussage diesbezüglich immer unsicher. Obwohl ein starkes KM-Enhancement eher für ein malignes Gliom spricht (mit Ausnahme des pilozytischen Astrozytoms beim jugendlichen Patienten), so korreliert das Ausmaß des Enhancements nicht verlässlich mit dem Grad der Malignität bzw. der Malignisierung des Tumors. Es wird immer wieder über maligne Gliome mit absolut fehlender Schrankenstörung und damit ausbleibendem KM-Enhancement berichtet und umgekehrt (76, 77, 78).

Mit den eingeschränkten Möglichkeiten bzgl. des Gliomgradings in Zusammenhang stehend sind mit konventioneller MR-Technik keine spezifischen Informationen zur *Gliomvaskularisation* erhältlich. Die Vaskularisation genauestens bereits in vivo zu monitoren, ist insofern von Bedeutung, da sie wesentliche Informationen zur Malignität des Tumors liefert und andererseits eine Hilfestellung bei der Auswahl eines geeigneten Biopsieortes geben kann. Auch bei der Therapiekontrolle spielt die Gliomangiogenese eine wichtige Rolle, da zahlreiche Therapien auch Einfluss auf die Gliomvaskularisation haben (bestimmte Formen der Chemotherapie, Strahlentherapie. u.a.).

Nach erfolgter Operation oder Strahlentherapie eines Glioms finden sich häufig KM-Anreicherungsmuster, die eine Differenzierung zwischen operationsinduzierten *reaktiven Veränderungen/Radionekrose* und *Rest/Rezidivtumor* nicht ermöglichen. Häufig kann eine Klärung dieser Frage nur durch weitere MR-Verlaufsuntersuchungen erzielt werden, oder aber es wird versucht mit anderen Methoden (z.B. PET) diese Frage zu beantworten.

Und nicht zuletzt sind mit der konventionellen MRT zwar hochaufgelöst morphologische Daten über den Tumor und die Tumorumgebung erhältlich, *funktionelle Informationen* zur Tumorbilogie (z.B. zur Genregulation, zum Wachstumsverhalten oder zur Tumorummunologie) können daraus jedoch nicht spezifisch entwickelt werden.

In den letzten Jahren ist die konventionelle MRT durch neue Techniken erweitert worden, die auch bei der MR-Bildgebung der Gliome z. T. von großer Bedeutung sind.

1. 3. Perfusions MRT

Insbesondere die Entwicklung von schneller MR-Bildgebung, aber auch die Anwendung von verschiedenen MR-Kontrastmitteln unterschiedlichen Molekulargewichtes erlaubt eine genaue Analyse der vaskulären Eigenschaften von Gliomen.

Mit konventioneller MR-Bildgebung kann, wie schon angesprochen, die Tumorneovaskularisation von Gliomen bisher nicht zufriedenstellend dargestellt werden. Obwohl die MRT die höchste Kontrastauflösung besitzt, ermöglicht sie kaum Aussagen zur Vaskularisation eines Tumors: die genaue örtliche Verteilung der Gefäße innerhalb des Tumors, die Differenzierung zwischen erhöhter Tumorneovaskularisation und gesteigerter Gefäßpermeabilität, die Entwicklung der Neovaskularisation im zeitlichen Verlauf der Gliomprogression, das Tumorgading (basierend auf der Tumorneovaskularisation) und das Verhalten der Tumoriangiogenese nach therapeutischen Maßnahmen sind bisher nicht ausreichend zu beurteilen. Auf Grund ihrer Schlüsselfunktion bei der Gliomentstehung einerseits und der neuen qualitativen und quantitativen MR-Möglichkeiten zur Visualisierung des Blutflusses andererseits drängt sich die Tumorneovaskularisation für eine grundlegende Spezifizierung der Bildgebung von Gliomen auf.

Vielversprechend in diesem Zusammenhang sind Entwicklungen in den letzten Jahren, bei denen

die konventionelle MR-Bildgebung, die eine ausschließliche Beurteilung der Tumormorphologie erlaubt, um eine funktionelle Komponente erweitert wird. Die *Perfusions MRT* basiert darauf, dass zeitliche Veränderungen des MR-Signals mit geeigneten schnellen MR-Sequenzen erfasst werden können. Da die Kinetik der Signalveränderungen auch Rückschlüsse auf die Mikrozirkulation innerhalb des untersuchten Gewebes zulässt, ermöglichen solche Methoden somit auch eine MR-tomographische Funktionsdiagnostik. Voneinander abgegrenzt werden muss die dynamische perfusionsgewichtete MR-Bildgebung (dMRT) nach Gabe eines paramagnetischen KM von der Spin-Labeling-Technik.

Perfusionsgewichtete MR-Bildgebung (dMRT) beruht darauf, dass die Signaländerung durch ein als Bolus injiziertes MR-Kontrastmittel mit Hilfe von schnellen Sequenzen (Echo-planarer Bildgebung, EPI; FLASH; U-FLAIR) ausgewertet wird. In einem ersten Schritt wird zunächst die Signaländerung vor, während und nach Applikation des KM-Bolus gemessen, hierfür werden schnelle Messesequenzen mit Aufnahmezeiten im Bereich von wenigen Sekunden pro Bild angewandt. Es werden sowohl T1-gewichtete Sequenzen benutzt, die die temporäre Signalerhöhung infolge des KM-bedingten Relaxationseffektes messen (79), als auch T2-gewichtete Sequenzen, die die Signalverluste während der KM-Passage auf Grund der Suszeptibilitätsunterschiede zwischen Gefäßraum und Umgebungsgewebe erfassen (79a). In einem zweiten Schritt müssen die gemessenen Signal-Zeit-Verläufe in Konzentrations-Zeit-Verläufe umgerechnet werden, da die Konzentration des applizierten KM nicht direkt (wie bei nuklearmedizinischen Verfahren) gemessen, sondern nur im zeitlichen Verlauf ermittelt werden kann. In einem dritten Schritt werden dann diese Konzentrations-Zeit-Verläufe mittels geeigneter Modelle zur KM-Kinetik weiter analysiert (Übersicht über die Methodik der perfusionsgewichteten MR-Bildgebung der Mikrozirkulation bei 80). Mit diesen Methoden lassen sich im wesentlichen drei Parameter der Mikrozirkulation darstellen: das regionale Cerebrale Blut-Volumen (rCBV), der regionale Cerebrale-Blut-Fluss (rCBF) und die regionale Capilläre-Permeabilität (rCP). rCBV ist definiert als das vom Blut durchflossene Gefäßvolumen (in ml) in einem Voxel dividiert durch die Gewebemasse (in g) innerhalb dieses Voxels. rCBF ist definiert als die Menge an Blut (in ml), die pro Zeiteinheit (in ml) durch ein Voxel strömt, dividiert durch die Masse des Gewebes (in g) im betrachteten Voxel. Dem entsprechen, auf das Tumorgewebe bezogen, das regionale Tumor-Blut-Volumen (rTBV) und der regionale Tumor-Blut-

Fluss (rTBF). Mittlerweile wurden diese Parameter in zahlreichen Studien an Tumoren unterschiedlichster Art sowohl tierexperimentell als auch an Tumorpatienten untersucht (81, 82, 83, 84). Basierend auf der mathematischen Berechnung von rTBV und rCP lassen sich für den jeweiligen Tumor entsprechende „Maps“ erstellen, die die Tumorerheterogenität differenzierter erfassen und sich bei Gliomen deutlich vom Anreicherungsverhalten in konventioneller, Gd-DTPA-verstärkter MR-Bildgebung unterscheiden (85, 86, 87, 88). So lässt sich mit diesen Methoden quantitativ die Vaskularisation innerhalb des Glioms bestimmen, es können Regionen erhöhter Tumolvaskularisation von niedriger vaskularisierten Tumorarealen abgegrenzt werden und es lassen sich Areale mit hoher Tumolvaskularisation von Regionen mit durchlässiger Blut-Hirn-Schranke (BHS) differenzieren (Abb. 2).

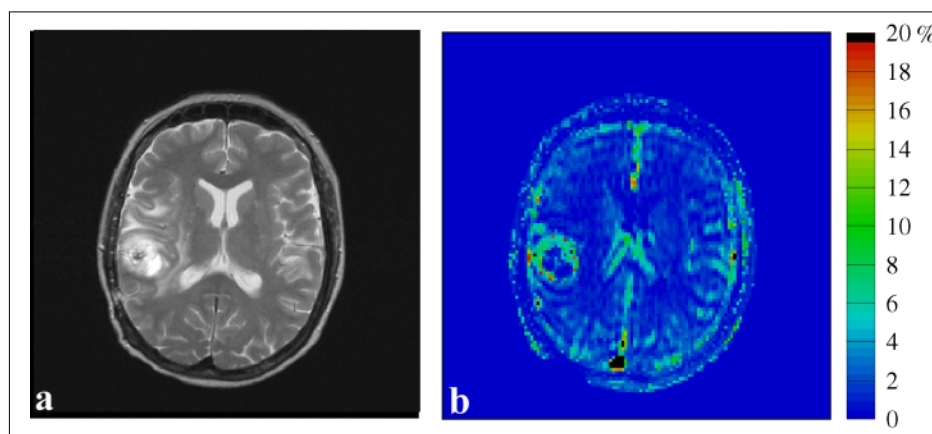


Abb. 2: Astrozytom WHO-Grad IV. Darstellung der Tumolvaskularisation

Berechnung des regionalen zerebralen Blutvolumens (rCBV) mittels dynamischer MR-Bildgebung. Der Tumor re. temporal zeigt im Randbereich eine deutlich erhöhte Vaskularisation im Vergleich zum umgebenden normalen Hirngewebe. Demgegenüber sind zentrale Tumoranteile wesentlich geringer vaskularisiert. T2w MRT (a) und Perfusions-Mapping (rCBV) nach paramagnetischer dynamischer Kontrastverstärkung (b).

Da Gefäßproliferation ein entscheidendes Kriterium beim histologischen Grading von Gliomen ist, verwundert es nicht, dass solche TBV-Maps eng mit dem Grad der Malignisierung korrelieren. Es konnte histologisch gezeigt werden, dass frühes Gd-DTPA-Enhancement in dynamischen MR-Untersuchungen mit der Gefäßdichte in Tumoren korreliert (89). Auch ist die Methode sensitiv genug, um quantitativ geringste Veränderungen des Blutvolumens in Tumoren nach Therapie (z.B. als Folge von Bestrahlung) zu erfassen, wie an niedrig-gradigen Astrozytomen gezeigt wer-

den konnte (90).

Während die Anwendung von Gd-DTPA bei Tumoren mit intakter BHS/BHTS auch für dynamische Untersuchungen sinnvoll ist, so ist bei malignen Gliomen mit vorwiegend gestörter BHS/BHTS die Verwendung dieses Kontrastmittels für die Erstellung von TBV-Maps allerdings problematisch. Da Gd-DTPA ein relativ kleinmolekulares Kontrastmittel (MW: 0,5 kD) ist, verlässt es bei gestörter BHS sofort den Gefäßraum, so dass selbst die ersten dynamischen Bilder unmittelbar nach Gd-DTPA-Bolus-Injektion (first pass Effekt) Mischbilder aus noch intravaskulärem und bereits interstitiellem Kontrastmittel sind. Ein Nachteil der bisher beschriebenen Methoden zur Ermittlung des rTBV und der rCP ist auch, dass es sich in der Regel um mathematische Tracer-Kinetik-Modelle handelt, die meist auf Hochrechnungen von Kompartiment-Modellen beruhen, die äußerst variabel sein können (91). Bei den meisten Untersuchungen wird ein 2-Kompartiment-Modell (Intravasalraum vs. interstitieller Raum) zu Grunde gelegt, wobei aber auch andere Modelle beschrieben sind (92). Die Anwendung von solchen hypothetischen Modellen und die aufwendigen Nachbearbeitungsverfahren dürften der Grund sein, weshalb diese Methoden bisher nur begrenzt Eingang in die klinische Praxis gefunden haben und eher Gegenstand von wissenschaftlichen Auswertungen waren.

Neue Möglichkeiten in diesem Zusammenhang bieten lang zirkulierende makromolekulare Kontrastmittel, die eine einfachere Differenzierung des intravaskulären gegenüber dem interstitiellen Kompartiment erlauben. Pharmakologisch handelt es sich um Verbindungen aus Makromolekülen (z.B. Albumin, Dextran, Polylysine) und einer unterschiedlichen Anzahl an Gd-DTPA-Konjugaten (93). Bisher wurden diese am Gehirn hauptsächlich dafür eingesetzt, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) experimentell zu untersuchen (94, 95). Die Anwendung von Makromolekülen als Kontrastmittel in Verbindung mit perfusionsgewichteter MR-Bildgebung sollte eine differenziertere Darstellung der Tumorvaskularisation auch bei Tumoren mit gestörter BHS (z.B. malignen Gliomen) erlauben.

Dem Perfusions MRT nach KM-Gabe ist die Spin-Labeling-Technik gegenüber zu stellen, welche auf der magnetischen Markierung des Blutes basiert, wobei das körpereigene Wasser als frei diffundierender Tracer dient. KM wird bei dieser Methode nicht appliziert. Bei dieser Technik werden H-Kernspins des körpereigenen Wassers durch Inversion oder Sättigung magnetisch mar-

kiert. Über eine Betrachtung der zeitlichen Abhängigkeit der Magnetisierung kann der regionale Blutfluss ermittelt werden. Bei der Spin-Labeling-Methode muss zwischen der ASL (arterial spin labeling) und der TSL (tissue spin labeling) unterschieden werden. Bei der ASL werden die Spins der arteriellen Zufuhr kontinuierlich gesättigt, während die Detektion im Gehirn stattfindet (95a). Bei dem TSL-Verfahren wird das zu detektierende Gewebe direkt invertiert. Die Tatsache, dass bei den Spin-Labeling-Techniken auf den Gebrauch von KM verzichtet werden kann, sollte insbesondere bei den HGG von Vorteil sein, da mit solchen Methoden die Probleme bei der Analyse der Tumervaskularisation, die durch eine Tumor-bedingt gestörte BHS/BHTS entstehen, umgangen werden können. Ein wesentlicher limitierender Faktor bei den Spin-Labeling-Techniken ist das nach wie vor unzureichende Signal/Rausch-Verhältnis. Systematische Untersuchungen von Gliomen mit diesen Techniken existieren derzeit allerdings noch nicht.

1. 4. Diffusions MRT

Die MR-Diffusionsbildgebung (DWI) basiert darauf, dass die MRT eine sehr hohe Sensitivität für Molekularbewegung aufweist. Mittels DWI lässt sich die normale Diffusion von Wasser innerhalb von Gewebe messen, wobei als Diffusion die regellose Bewegung von Molekülen gemeint ist, auch als "Brownsche Molekularbewegung" beschrieben. Diffusion führt insgesamt zu einer Reduktion der Signalintensität in allen MR-Sequenzen, während sich verminderte Diffusion als hyperintens bemerkbar macht. Der Grad der Diffusion lässt sich durch den "apparent diffusion coefficient" (ADC) quantifizieren. Innerhalb des Gehirns weist der Diffusionskoeffizient interindividuell keine sehr große Variabilität auf. Im allgemeinen ist in der grauen Substanz die Diffusion ungefähr 2,5-mal geringer als die von Wasser. In der weißen Substanz ist der Diffusionskoeffizient dann deutlich erniedrigt, wenn die Myelinfasern senkrecht zum Diffusionsgradienten verlaufen. Ganz allgemein spielt die Myelinisierung der weißen Substanz in Diffusionsrichtung eine große Rolle und beeinflusst wesentlich die ADC-Werte.

DWI ist klinisch mittlerweile in der Frühdiagnostik von zerebraler Ischämie eine etablierte Methode. Zu einem Zeitpunkt, wo die meisten anderen bildgebenden Methoden noch unauffällig sind, lassen sich Hirninfarkte mittels MR-Diffusionsbildgebung hyperintens mit einer Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten (ADC-Wertes) darstellen. Hintergrund der ADC-Änderungen ist u.a. die intrazelluläre Wasserakkumulation ("zytotoxisches Ödem") als Folge der Energiestoff-

wechselstörung im Rahmen stattgehabter Ischämie.

Nur wenige Untersuchungen stellen bislang DWI bei Gliomen in den Vordergrund. Unter Benutzung einer Multi-Slice-EPI-Sequenz ist eine Korrelation des Gradings mit den ADC-Werten beschrieben: Danach sind die ADC-Werte in HGG signifikant höher als in LGG (96). Erklärt wird dies mit der erhöhten Zelldichte in HGG, welche die Diffusion von Wasser beeinträchtigt. Möglicherweise eröffnen sich hier Wege, über die mit solchen Diffusions-gewichteten Aufnahmen die Tumoreale charakterisiert werden können, die die höchste Zelldichte besitzen. Dies könnte z. B. Konsequenzen für die Auswahl eines geeigneten Ortes im Rahmen einer stereotaktischen Biopsie haben. In einer anderen Studie wurden ADC-Werte von zerebralen Metastasen als signifikant höher beschrieben als in HGG, was zur differentialdiagnostischen Abgrenzung dieser Läsionen voneinander dienen könnte (97). Eine weitere Anwendung könnte diese Methode in der Differentialdiagnose zwischen einem Glioblastom und einem Abszess erfahren: Während sich das Glioblastom in der Regel hypointens darstellt, leuchtet der Abszess stark hyperintens in der DWI auf (98). Der dem zu Grunde liegende Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Auch die Anwendung von DWI zur Beurteilung der Therapieansprache bei Chemotherapie von experimentellen Hirntumoren ist beschrieben (99). Insgesamt repräsentieren diese Untersuchungen jedoch eher singuläre vorläufige Ergebnisse. Während bei der zerebralen Ischämie die MR-Diffusionsbildgebung ein nicht mehr wegzudenkender Bestandteil in der Frühdiagnostik von Infarkten geworden ist, ist die letztendliche Bedeutung dieser Methode bei der Diagnostik von Gliomen noch nicht voraussehbar, weitere Untersuchungen müssen diese Frage klären.

1. 5. Funktionelle MRT

Während etwa die dynamische Abbildung von Vaskularisationsparametern bei Hirntumoren ebenfalls *funktionelle* Informationen liefert, so wird gewöhnlich unter dem Begriff „funktionelle Magnetresonanztomographie“ (fMRT) im engeren Sinne die Darstellung von Signaländerungen im Gehirn verstanden, welche infolge definierter Aktivierungen des zerebralen Kortex durch äußere Reize auftreten bzw. welche durch eigene Aktivitäten der untersuchten Person hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass neuronale Aktivität immer mit einer Steigerung des Energieverbrauches in Form von Erhöhung des regionalen Blutflusses und

einer verstärkten Sauerstoffzufuhr verbunden ist. Über eine Messung der Änderung des regionalen Blutflusses und des Anstiegs des Sauerstoffgehaltes im Blut lässt sich mittels fMRT indirekt die neuronale Gehirnaktivität visualisieren: Vermehrtes sauerstoffreiches Oxyhämoglobin und gleichzeitige Verminderung des Desoxyhämoglobins sind mit einer Verminderung des Unterschiedes zwischen der Suszeptibilität des Blutes und des umgebenden Gewebes verbunden, so dass sich mit entsprechenden MR-Sequenzen vermehrtes Oxyhämoglobin im Blut als Signalsteigerung nachweisen lässt (100, 101).

In der Diagnostik von Patienten mit Gliomen spielt diese Methode insbesondere in der präoperativen Vorbereitung von Patienten mit solchen Tumoren eine Rolle. So lässt sich individuell für den Patienten die Beziehung des Tumors zwischen funktionell wichtigen Hirnarealen und dem Tumor selbst herstellen (Abb. 3).

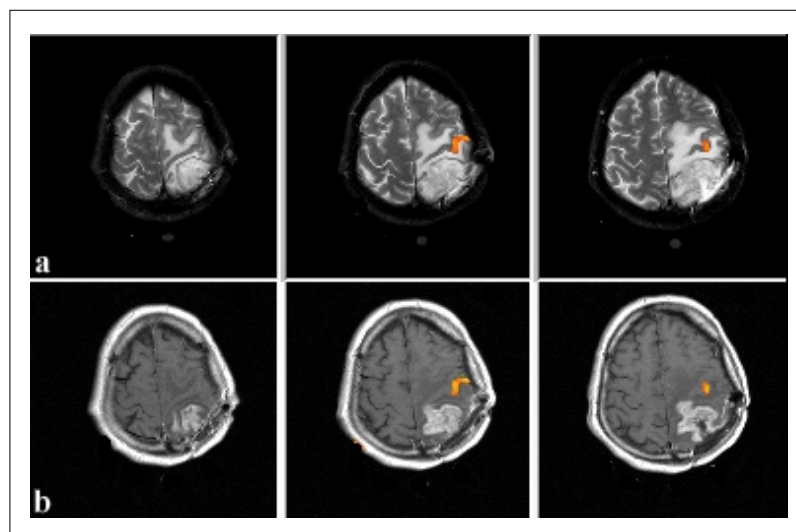


Abb. 3: Glioblastom occipital (Rezidiv). fMRT

Aktivierungsstudie, Bewegung der re. Hand. Die durch den Tumor bedingte BHS-Störung reicht bis knapp an den Gyrus praecentralis heran, das Ödem reicht darüber hinaus. T2w axiale (a) und T1w axiale fMRT nach paramagnetischer Kontrastverstärkung (b).

Am etabliertesten ist die klinische Anwendung dieser Methode bislang bei der Darstellung des Tumors in der Abgrenzung zum sensomotorischen Kortex (102, 103, 104, 105).

Solche Untersuchungen können präoperativ Informationen zum Risiko der chirurgischen Intervention, was die Gefährdung dieser Hirnareale anbelangt, geben. Neben der Darstellung des

sensomotorischen Kortex lassen sich aber auch andere kortikale Hirnregionen visualisieren, sofern sich geeignete Aktivierungsbedingungen (z. B. visuelle Reize, auditive Reize) schaffen lassen und die Gliome in der Nachbarschaft von solchen Hirnregionen wachsen (104, 106).

Eine Darstellung dieser Hirnareale für jeden Patienten individuell ist insofern von Bedeutung, da z. B. der motorische Kortex durch das Gliom selbst häufig verlagert, aber auch reorganisiert ist (102, 107, 108). Ein Methodenvergleich für die Darstellung des motorischen Kortex zwischen offener kortikaler Stimulation während des neuro-chirurgischen Eingriffes und präoperativem Finger-Tapping mit konsekutiver MR-Visualisierung des Kortex erbrachte eine hohe Konkordanz zwischen diesen beiden Verfahren (107, 109). fMRT bei Gliompatienten ist sowohl bei neurochirurgischen Eingriffen, aber auch im Rahmen von anderen Therapieverfahren (z. B. interstitielle Laser-Thermo-Therapie) nicht nur in der *präoperativen* Diagnostik ein interessantes Verfahren, sondern es kann auch zum *intraoperativen* Monitoring der neuronalen Aktivität herangezogen werden (108).

Problematisch bezüglich der Durchführung von fMRT bei Gliompatienten ist die Tatsache, dass die Aktivierung stark von der Kooperationsfähigkeit, insbesondere zur Durchführung komplexer Finger- bzw. Handbewegungen des Patienten abhängig ist, und diese bei den schwer kranken und auch häufig bewegungsunruhigen Gliompatienten oft reduziert ist. Immerhin bewegen sich die Angaben aus der Literatur bzgl. der fMRT-Untersuchungen, bei denen sich aus den genannten Gründen bei Gliompatienten keine aussagekräftigen Daten erheben ließen, zwischen 8% und 30% (104) (110). Zur Darstellung des motorischen Kortex ist neben der Aktivierung der motorischen Handregion auch die Visualisierung des übrigen motorischen Kortex erstrebenswert, was derzeit technisch eher noch ein Problem darstellt. Auch gibt es Diskussionen bezüglich Interferenzen zwischen der durch den Tumor verursachten erhöhten Vaskularisation und der aktivierungsbedingten Mehrdurchblutung (108). Nach wie vor ist es auch noch ein ungelöstes Problem, den Tumor selbst nicht sicher direkt abgrenzen und letztlich nicht eindeutig von dem funktionell entsprechenden kortikalen Areal differenzieren zu können.

1. 6. MR-Spektroskopie (MRS)

Die Protonen- ^1H -MR-Spektroskopie stellt eine Methode dar, mit der eine Vielzahl von Metaboliten

in vivo im Tumor und in der Tumorumgebung nicht invasiv bestimmt werden kann. Auch andere Elemente, wie ^{31}P Phosphor, ^{13}C Kohlenstoff, ^{23}Na Natrium und ^{19}F Fluor wurden ebenfalls angewandt, spielen jedoch gegenwärtig in der klinischen Anwendung keine so große Rolle.

Messbare Metaboliten für die Tumordiagnostik sind insbesondere N-Acetylaspartat (NAA), Cholin (Cho), Myoinositol (MI), Creatinin (Cr), Laktat (La) und Lipide (Li).

Bestimmt werden sowohl die relativen Konzentrationen als auch die Quotienten der Hauptmetabolite, wobei das Resonanzsignal des Cho bei allen in vivo Untersuchungen die konstante Resonanzlinie bei 3,2 ppm darstellt, mit der andere Metaboliten verglichen werden können (111, 112). Die gewonnenen Daten können entweder als chemische Spektren innerhalb einer größeren ROI oder in einem tomographischen Format dargestellt werden, aus denen dann Maps, basierend auf einzelnen oder multiplen Peaks, erstellt werden (113, 114, 115, 116, 117).

NAA mit einem Resonanzsignal bei 2,0 ppm bezieht sich vorwiegend auf das in Nervenzellen vorkommende N-Acetylaspartat und gilt daher als neuronaler Marker. Jeder Prozess, der Neurone zerstört, geht mit einer Reduktion des NAA-Peaks einher. So ist z. B. im Rahmen einer Ischämie NAA deutlich herabgesetzt (118). NAA ist im Neuron mit Glutamat und N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat kolokalisiert; die genaue Rolle, die NAA jedoch im Gehirn spielt, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. In Gliomen ist NAA auf Grund der fehlenden neuronalen Komponente im Vergleich mit normalem Hirngewebe i. d. R. um 40 – 70 % herabgesetzt, unabhängig vom Tumorgading (119). Der NAA-Cho-Quotient ist im LGG geringer als im HGG herabgesetzt (116, 120). In Tumoren außerhalb des Gehirns ist NAA überhaupt nicht zu finden (121). Auch in der das Gliom umgebenden Ödemzone wurde NAA als bis zu 50 % reduziert beschrieben (122).

Der Peak des Resonanzsignals von Cho bei 3,2 ppm setzt sich vorwiegend aus Glycerophosphocholin (GPC), Phosphocholin (PC) und Phosphatidyl-Cholin (PPC) zusammen. Cho spielt eine wesentliche Rolle beim Phospholipid-Stoffwechsel von Zellmembranen. Zahlreiche Studien zeigten ein deutlich erhöhtes Cho bei LGG, was im Zusammenhang mit der gesteigerten Zellmembran-Phospholipid-Synthese im Rahmen der Tumorzellproliferation und des destruktiven Prozesses an der Zellmembran erklärt wurde (123, 124, 125, 126). Auch in vitro Analysen von Operationsmaterial mittels MRS bestätigten diese erhöhten Cho-Werte bei niedrig-gradigen

Gliomen (126, 127, 128). Andererseits zeigen häufig HGG und hier gerade Glioblastome erniedrigte Cho-Werte im Vergleich zu LGG (129). Eine Erklärung dieser niedrigen Cho-Werte bei Glioblastomen wäre das Vorhandensein von nekrotischen Arealen innerhalb dieser Tumoren.

Insgesamt wird die Interpretation der Cho-Werte erschwert und damit die Bedeutung des Cho für das Grading von Gliomen eingeschränkt, dass immer wieder der Cho/CR-Quotient bei HGG im Vergleich zu LGG auch als erhöht beschrieben wurde (120, 130). Wird jedoch innerhalb des Cho-Resonanzsignals noch einmal zwischen GPC, PC und PPC differenziert, so zeichnet sich ab, dass ein hohes PC als ein Indikator für den Malignitätsgrad gewertet werden kann, da es bei HGG fast immer deutlich erhöht ist (131). Beim LGG setzt sich das Cho-Signal hauptsächlich aus GPC mit nur einem geringen Anteil von PC und CHO zusammen. GPC scheint eine wesentliche Rolle beim Zellmembranabbau zu spielen. Die Bestimmung des Cho kann auch hilfreich bei der Differenzierung zwischen Tumorrezidiv und Strahlennekrose sein. Regionen mit hohem Cho-Signal repräsentieren ein Tumorrezidiv, während niedrige Cho-Werte Nekrose nach Bestrahlung anzeigen (114). Problematisch und diagnostisch kaum zu differenzieren sind die Fälle, bei denen eine Koexistenz von nekrotischen Arealen und Tumorrezidiv innerhalb desselben Tumors herrscht. Hier kann nicht sicher entschieden werden, wo der Effekt der Strahlentherapie endet und der Tumor beginnt.

Der Peak des Cr-Resonanzsignals bei 3,03 ppm setzt sich aus Cr, Cr-Phosphat und Gammaaminobuttersäure zusammen, wobei ein zweiter Cr-Peak bei 3,94 ppm zu finden ist. Die Analyse des Cr erlaubt insbesondere Aussagen über den energetischen Zustand eines Systems (132). Typischerweise ist Cr erhöht in hypometabolischen und erniedrigt in hypermetabolischen Zuständen. Bei Gliomen ist Cr, verglichen mit NAA, i. d. R. nur mäßig erniedrigt. Auch der Cr-Cho-Quotient fällt mit zunehmendem Malignitätsgrad ab (120).

Der La-Peak ist geteilt und erscheint bei 1,22 ppm und einem zweiten Peak bei 4,1 ppm. Während der Laktat-Spiegel im normalen Gehirn in der Regel niedrig ist, weist ein erhöhter Spiegel darauf hin, dass als Zeichen von Hypoxie die normale Atmungskette beeinträchtigt ist (133). Allerdings

zeigen zahlreiche Studien, dass der Laktat-Spiegel bei Gliomen nicht unbedingt mit dem Grading der Tumoren korreliert (120, 134). Bei der Differentialdiagnose von Radionekrose und Rezidivtumor weist ein hoher La-Wert eher auf eine Strahlenfolge als auf einen Rezidivtumor hin (114).

Die Protonen von Lipiden haben einen Peak bei 0,8, 1,2, 1,5 und 6,0 ppm. Diese Peaks beinhalten Methyl-, Methylen- und Vinyl-Protonen von ungesättigten Fettsäuren (121, 135). Sie sind beim HGG erhöht und spiegeln am ehesten nekrotische Tumorregionen wider (113, 128). Allerdings kommt es leicht zur Artefaktbildung durch „Voxel-Kontamination“ auf Grund von Fett innerhalb der Kopfschwarte.

Auch Myoinositol (Resonanzpeak bei 3,56 ppm) wird als ein wichtiger Metabolit zum Grading von Gliomen beschrieben, wobei der MI/Cr Quotient beim HGG in der Regel erhöht zu sein scheint (136, 137). Im Gehirn wird MI hauptsächlich in glialen und weniger in neuronalen Zellen gefunden.

Insgesamt stellt die MRS unter der Verwendung von Methoden der komplexen Datenanalyse und bei Berücksichtigung multipler Stoffwechselfparameter eine wesentliche Erweiterung der konventionellen MRT in der Diagnostik von Gliomen dar, wobei sich diese Tumoren ganz allgemein durch einen niedrigen NAA-Cr-Quotienten und einen erhöhten Cho-Cr und MI-Cr-Quotienten charakterisieren und von anderen pathologischen Veränderungen innerhalb des Gehirns unterscheiden lassen. Daneben kann die MRS aber auch eine Hilfestellung beim Therapiemonitoring von Gliomen und auch bei Fragen der Differentialdiagnose von Resttumor vs. postoperativen Veränderungen oder auch Rezidivtumor vs. Strahlennekrose geben. Werden die einzelnen Studien bzgl. der Diagnostik von Gliomen ausgewertet und miteinander verglichen, so sind die Ergebnisse noch durchaus variabel, insbesondere weil unterschiedliche MRS-Techniken und auch Auswertetechniken verwandt werden. Ein großes Handicap der meisten Studien ist auch, dass die „single-voxel“-Technik angewandt wurde. Die Auswertung eines einzelnen Voxels hat gegenüber der dreidimensionalen MRS insbesondere den Nachteil, dass eine solche Technik nicht in ausreichendem Maße der Heterogenität gerecht wird, die bei den meisten Gliomen innerhalb des Tumorgewebes existiert (138, 139). Nach wie vor ist auch die MRS eher noch primär von wissenschaftlichem Interesse, ohne dass sie bisher – abgesehen vielleicht von wenigen Zentren - breiten

Einzug in die klinische Praxis gefunden hat.

1. 7. Nuklearmedizinische Untersuchungsverfahren (PET und SPECT)

Die ersten PET-Untersuchungen an Patienten mit Gliomen reichen bis in die 80er Jahre zurück (140, 141). Wegen des großen Aufwandes, sowohl apparativ als auch interdisziplinär-personell, standen zunächst grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen im Vordergrund; erst in den letzten Jahren erfolgte zunehmend durch die Etablierung von PET-Zentren auch in der Diagnostik von Gliomen ein breiter klinischer Einsatz dieser Methode. Annähernd 1000 PET-Radiopharmaka wurden bislang entwickelt, von denen allerdings nur wenige im praktisch-klinischen Einsatz sind. Bei Gliomen sind dies zur Untersuchung der Aminosäureaufnahme und des Proteinstoffwechsels ^{11}C -Methionin und ^{18}F -Thyrosin, zur Quantifizierung des Energiestoffwechsels ^{18}F -Desoxyglukose (FDG) und zur Perfusionsmessung der Tumervaskularisation ^{15}O -markiertes Wasser.

Theoretische Grundlage der PET-Untersuchungen ist, dass sich der Stoffwechsel von Hirntumoren vom gesunden Hirngewebe durch eine gesteigerte Glukoseumsatzrate, eine vermehrte Aufnahme von Aminosäuren zur Proteinsynthese, aber auch durch eine veränderte Perfusion unterscheidet und sich dies mittels PET visualisieren lässt.

Die wesentlichen Einsatzgebiete von PET in der Gliomdiagnostik sind zur Zeit bei

- der Unterscheidung des Tumorrezidivs von der strahleninduzierten Nekrose,
- dem Gliomgrading (Unterscheidung zwischen einem LGG und HGG),
- der Verlaufsbeurteilung eines zunächst niedrig-gradigen Glioms (weitere Entdifferenzierung?),
- der lokalen Abgrenzung und Ausdehnung des Tumors und nicht zuletzt bei
- der Biopsieplanung zur Bestimmung des optimalen Biopsieortes.

Es ist seit langem bekannt, dass Strahlentherapie einen wesentlichen Einfluss auf die Permeabilität der Gefäße hat, d.h. ein Großteil der Gefäße ist nach erfolgter Radiatio in ihrer Durchlässigkeit beeinträchtigt. Dadurch zeigt sich häufig sowohl in der CT als auch in der MRT KM-anreicherndes, raumfordernd wirkendes Gewebe, welches dann als Strahlennekrose gewertet wird. Häufig kann dieses Gewebe nicht sicher von einem Tumorrezidiv unterschieden werden (s. 1.2.3.) Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Anwendung von FDG-PET in diesem Zusammenhang,

wobei davon ausgegangen wird, dass sich Tumorrezidive frühzeitig über einen Stoffwechselanstieg im entsprechenden Areal bemerkbar machen, während dieser bei nekrotischem Gewebe fehlt. Beim HGG wird bezüglich der Unterscheidung zwischen Tumorrezidiv und Strahlennekrose eine Sensitivität für die FDG-PET zwischen 80% und 100% in der Literatur angegeben (142, 143). Bei LGG, wo hinsichtlich der FDG-Aufnahme kein wesentlicher Unterschied zwischen Tumor und Nekrose existiert, eignet sich FDG weniger. Hier wird der Einsatz von C¹¹-Methionin empfohlen, da dieser Marker von LGG in höherem Maße aufgenommen wird (144, 145, 146). Allerdings wird auch die hohe Empfindlichkeit der FDG-PET bei HGG in einigen Untersuchungen relativiert, in denen die Verlässlichkeit von FDG-PET bei der Differentialdiagnose zwischen Radionekrose und Rezidivtumor zumindest teilweise in Frage gestellt wird (147, 148). Insbesondere wird die Frage aufgeworfen, inwieweit nicht die Bestrahlung selbst den Glukosemetabolismus beeinträchtigen kann, was dann zu falsch positiven Ergebnissen von Radionekrosen führen kann.

Das unterschiedliche Verhalten in der FDG-Aufnahme zwischen LGG und HGG kann auch eingesetzt werden, um zwischen Gliomen unterschiedlichen Gradings zu unterscheiden. Dies gilt sowohl für das primäre Gliomgrading als auch für die Frage, ob ein primäres LGG im Verlauf zu einem HGG entdifferenziert (149).

Interessant sind auch Untersuchungen, in denen die FDG-Aufnahme mit der Prognose von Gliomen korreliert wurde. Hier zeigte sich, dass sich unter den Patienten mit einem HGG eine Gruppe von Patienten mit einer guten Prognose (hypometabolisch, 1 Jahr Überlebenszeit bei 78 %) von einer Gruppe mit einer schlechteren Prognose (hypermetabolisch, 1 Jahr Überlebenszeit 29 %) unterscheiden ließ (150). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Studien jüngerer Datums, die den FDG-Score als „Prädiktor“ für das Überleben von Gliompatienten einstufen (151), wobei eine engere Beziehung der Krankheitsprognose zum FDG-Score als zum histologischen Tumorgrading beschrieben wurde (141).

Allerdings zeigen auch Untersuchungen, dass die Regel, wonach sich das LGG durch einen Hypometabolismus auszeichnet, während das HGG durch einen Hypermetabolismus gekennzeichnet ist, nicht immer zuverlässig ist. So werden immer wieder Fälle beschrieben, die von dieser Regel abweichen und sich dann falsch positive oder negative Ergebnisse ergeben (152, 153, 148). Ein wesentlicher Nachteil auch der FDG-PET ist, dass das normale Gehirn selbst schon

einen relativ hohen Energieumsatz hat und der Unterschied zu neoplastischem Gewebe eher gering ist.

Die FDG-Aufnahme innerhalb eines Glioms ist in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumorareals heterogen. Dies findet sein histologisches Korrelat z. B. in der Tatsache, dass neben gut differenzierten Tumorarealen anaplastische Tumorregionen gefunden werden, wobei sich das histologische Grading grundsätzlich immer nach dem am wenigsten differenzierten Areal richtet. Es ließ sich in dem Zusammenhang zeigen, dass eine Gewinnung von Biopsieproben zur histologischen Auswertung aus Arealen mit hoher FDG-Aufnahme diagnostische Aussagen ermöglicht, die eine signifikant günstigere Korrelation zur Überlebenszeit des Patienten erbringen, als Biopsien rein nach der konventionellen, morphologischen CT/MRT-Bildgebung (154, 155, 156).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der PET-Gliomdiagnostik stellt der Gebrauch von Radiopharmaka dar, die in vivo Informationen über die Zellproliferationsrate geben. Erste vielversprechende Untersuchungen diesbezüglich liegen hierzu mit ^{11}C -Thymidin und ^{18}F -Desoxyuridin vor (157). ^{11}C -Thymidin ist ein Marker, der zuvor sowohl in Zellkultur- als auch in tierexperimentellen Untersuchungen angewandt wurde, um die DNA-Syntheserate von Tumoren zu quantifizieren (158). In einer Untersuchungsserie an allerdings nur 13 Patienten zeigte sich, dass mit ^{11}C -Thymidin in annähernd 50% der Fälle zusätzliche Informationen zu den FDG-PET Untersuchungen gewonnen werden konnten. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass eine Analyse der Tumorproliferationsrate auch in vivo möglich ist, wenngleich dies durch weitere Untersuchungen bestätigt werden muss.

Die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) hat gegenüber PET hauptsächlich den Nachteil des geringeren Auflösungsvermögens. Ferner steht derzeit für SPECT-Untersuchungen nicht eine vergleichbar große Palette von Radiopharmaka zur Verfügung, auch ist die quantitative regionale Bestimmung von Stoffwechselfparametern innerhalb des Glioms mit dieser Methode gegenüber PET eingeschränkt. Der Vorteil dieser Methode liegen darin, dass sie nach wie vor häufiger verfügbar und billiger in der Anwendung ist. In der Vergangenheit spielte in der Diagnostik von Gliomen bei den SPECT Untersuchungen vornehmlich ^{201}Tl eine Rolle, wobei diese Methode

eher beim Grading von HGG verlässlich ist, bei LGG wird über „falsch positive“ Ergebnisse berichtet (159).

1. 8. Xenon CT

Ähnlich wie die dMRT erlaubt auch die Xenon-CT (Xe CT) Aussagen zur Vaskularisation von Gliomen. Xe CT ist eine seit einiger Zeit etablierte Methode, mit der rCBF (Xe CT CBF) und der Blutgewebeverteilungskoeffizient λ gemessen werden können. Xenon liegt in seiner Atomzahl benachbart zu Jod, es hat also ähnliche KM-Eigenschaften wie die üblichen in der Computertomographie eingesetzten jodhaltigen Kontrastmittel. Im Gegensatz zu diesen Kontrastmitteln passiert Xenon jedoch frei die BHS. Die Methode beruht darauf, dass ein Xenon-Sauerstoff-Gemisch während der „Wash-in-Phase“ inhaliert wird, während gleichzeitig die endexpiratorische Xenon- und CO₂-Konzentration aufgezeichnet wird. Beruhend auf den Untersuchungen von Kety und Schmidt (160) lassen sich aus den gewonnenen Daten rCBF und λ berechnen (161, 162). Obwohl die Xe CT CBF-Messungen schon seit Jahren etabliert sind, gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der Anwendung dieser Methode bei Gliomen beschäftigen (163, 164, 165, 166).

Xe CT CBF-Messungen bei Patienten mit Gliomen ergaben einen zu erwartenden niedrigen rCBF bei NGG und einen deutlich höheren rCBF bei HGG (164). Der rCBF lag bei den Gliomen generell immer zwischen dem rCBF des Kortex und der weißen Substanz der nicht betroffenen Hirnhemisphäre. Dies steht im Einklang mit Messungen an experimentellen Hirntumoren (167, 168) und menschlichen Gliomen (147, 169) mittels PET. Auch in XeCT CBF-Messungen ließ sich ein relativ hoher CBF im Kortex der betroffenen Hemisphäre außerhalb der umgebenden Ödemzone beobachten, was sowohl klinisch als auch tierexperimentell mit anderen Methoden bestätigt werden konnte (168, 170). Interessant in diesem Zusammenhang sind auch Beobachtungen von Nakagawa und Mitarbeitern, die bei Patienten mit HGG - verglichen mit gesunden Probanden - einen signifikant erniedrigten Blutfluss in der nicht tumortragenden Hemisphäre messen konnten (164). Dieser Effekt war bei HGG größer als bei LGG. Er wird mit dem im allgemeinen erhöhten intrakraniellen Druck bei Hirntumorpatienten erklärt (169, 171). Blutflussmessungen bei Patienten mit Hirntumoren wurden in Vielzahl, insbesondere in den 70er und 80er Jahren mittels PET durchgeführt (146, 172, 173). Xe CT zeigt jedoch im Vergleich zu den PET-Untersuchungen eine insge-

samt höhere Auflösung der Tumoren. Nasel und Mitarbeiter verglichen den λ mit dem Xe CT CBF, insbesondere zur Analyse von Patienten mit Gliomen, welche im CT und/oder MRT keine KM-Anreicherung zeigten und daher zunächst als niedrig-gradig klassifiziert wurden (165). Die Histologie bei diesen Patienten ergab ein Grading nach WHO von II bis IV, wobei die Autoren zeigten, dass sich λ signifikant mit dem Grading korrelieren ließ: HGG zeigten ein signifikant erniedrigtes λ , verglichen mit LGG. Damit bietet die XeCT zumindest Ansätze, bei nicht KM-anreichernden Gliomen die maligneren Tumoren herauszufiltern. Dass sich auch hinter nicht KM-anreichernden Läsionen HGG verstecken können ist seit langem bekannt (174). Im therapeutischen Interesse ist es auch, artdiagnostische Informationen bezüglich eines möglichen Oligodendroglioms zu bekommen, da Oligodendrogliome innerhalb der Gruppe der Gliome ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie zeigen (175). Auch dazu leistet Xe CT einen Beitrag, da bei Oligodendrogliomen - verglichen mit den übrigen Gliomen - signifikant höhere λ -Werte gefunden wurden (165).

II. ZIEL DER ARBEIT

Während die konventionellen Schnittbildtechniken und hier insbesondere die MRT eine hohe Weichteildifferenzierung aufweisen, bieten nuklearmedizinische Methoden (PET, SPECT), aber auch die MR-Spektroskopie zwar funktionelle Informationen zur Tumorbiologie, haben jedoch den Nachteil, dass ihr Auflösungsvermögen niedrig ist. Insofern ist die Entwicklung einer Technik, die eine hohe Gewebeauflösung mit Informationen auf funktionell-zellulärer Ebene verknüpft, erstrebenswert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits experimentelle Gliome nach Injektion von Dextran-Eisenoxidpartikeln näher zu charakterisieren und andererseits Strategien zur Verbesserung der derzeitigen MR-Diagnostik von Gliomen zu entwickeln. Dies beinhaltet insbesondere Fragen, wie sich die eigentliche Tumorgrenze spezifischer darstellen lässt und ob sich die Tumorzellen selbst kernspintomographisch visualisieren lassen, wie sich mit diagnostischen Pharmaka die primär intakte BHS überwinden lässt und wie sich Parameter der Tumorangiogenese bei Gliomen differenziert mittels Bildgebung darstellen lassen. Nicht zuletzt steht hinter den Untersuchungen der Anspruch, die MRT bei der Untersuchung von Gliomen als eine Methode zu etablieren, welche neben der rein morphologischen Beschreibung der Tumore funktionelle Informationen zur Tumorbiologie (z. B. Tumorzellphagozytose, Tumorangiogenese) liefert und die es erlaubt, auch neuere Therapien (z.B. anti-angiogenetische Therapie) nicht-invasiv in vivo zu monitoren.

Dextran-Eisenoxidpartikel wurden für diese Untersuchungen als Modellsubstanz genutzt, da sie sich auf Grund ihrer hohen magnetischen Potenz mittels MRT in sehr niedrigen Konzentrationen in vivo nachweisen lassen, sie einen relativ kleinen Durchmesser haben und sich chemisch leicht, z. B. zur spezifischen Bindung an zelluläre Oberflächenrezeptoren, modifizieren lassen. Für experimentelle Zwecke sind sie insofern auch gut geeignet, da sie sich mit Eisenfärbungen histologisch leicht im Gewebe nachweisen lassen; dies erlaubt eine zuverlässige Interpretation der häufig komplexen Signalveränderungen durch Korrelation der MRT mit der histologischen Gewebemorphologie. Auch lassen sich diese Partikel leicht mit Immunfluoreszenzfarbstoffen markieren und eignen sich so besonders auch für in vitro Untersuchungen.

III. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

1. Grundlagen

1. 1. Einteilung und Wirkungsmechanismus von MR-Kontrastmitteln

In der Anfangszeit der MRT wurde die Anwendung von Kontrastmittel für überflüssig gehalten, da man annahm, dass die hohen Weichteilkontraste der Methode ausreichend sein würden, um eine genaue Gewebedifferenzierung zu ermöglichen. Damals wurde davon ausgegangen, dass über eine genauere Bestimmung der Gewebsrelaxationszeiten mittels Relaxometrie eine Klassifizierung und ein Grading von Tumoren möglich sein würde. Die erwartete hohe Spezifität der MRT bestätigte sich in der Folge nicht, was nicht zuletzt die Legitimation für die Entwicklung von Kontrastmitteln für die MRT bedeutete. Seit Anfang der 80er Jahre werden MR-Kontrastmittel entwickelt, zunächst mit der Intention einer Verbesserung des Kontrastes zwischen Geweben mit ähnlichen magnetischen Eigenschaften. Im Verlauf der Kontrastmittelforschung wurde das Anwendungsspektrum erweitert. Es wurden neue KM entwickelt mit dem Ziel einer spezifischeren Visualisierung der Blut-Hirn-Schranke, der Messung der Organperfusion und der Entwicklung von zellspezifischen Kontrastmitteln, auch mit der Möglichkeit einer Funktionsbeurteilung des aufnehmenden Gewebes.

Das Wirkungsprinzip der MR-Kontrastmittel unterscheidet sich wesentlich von anderen in der Radiologie eingesetzten Kontrastmitteln. Die konventionellen Röntgenkontrastmittel bewirken durch einen hohen Jod- bzw. Bariumanteil eine direkte Abschwächung von Röntgenstrahlen und führen so zu einer erhöhten Dichte im dargestellten Röntgenbild mit einem entsprechenden höheren Wert auf der Grauskala des Analogbildes. Im Gegensatz zu den konventionellen Röntgenkontrastmitteln führen die MR-Kontrastmittel nicht selbst zu einem Signalwechsel, sondern verändern die Protonenrelaxationen ihrer unmittelbaren Nachbarschaft. Die Grundlagen heutiger MR-Kontrastmittel wurden bereits 1946 von Bloch gelegt, der damals zeigte, dass Kernspinrelaxationsprozesse durch paramagnetische Substanzen verstärkt werden können (176). Später beschrieben Solomon und Bloembergen den relaxationsverstärkenden Effekt von paramagnetischen Stoffen in Lösungen (177, 178).

Die Einteilung von KM ist komplex, wobei sie nach

- dem Kompartiment, welches sie markieren (intrazellulär oder extrazellulär),
- ihrem Signalverhalten (positives vs. negatives Signalverhalten) oder
- ihren magnetischen Eigenschaften (diamagnetisch, paramagnetisch, ferromagnetisch, superparamagnetisch) erfolgen kann.

Zur detaillierten Erörterung der MR-Kontrastmitteleinteilung sei auf die Arbeit von Enochs (179) und im deutschsprachigen Raum von Laniado (180) verwiesen.

Legt man die magnetischen Eigenschaften des MR-Kontrastmittels zugrunde, so stellt die magnetische Suszeptibilität im Magnetfeld ein wesentliches Charakteristikum dieses KM dar. Als Suszeptibilität wird das Verhältnis zwischen Magnetisierung und externem Magnetfeld bezeichnet. Die Art der Magnetisierbarkeit lässt im wesentlichen zwischen zwei Formen von Kontrastmitteln unterscheiden,

- den paramagnetischen und
- den superparamagnetischen Kontrastmitteln.

Paramagnetische Substanzen (Gadolinium-Gd³⁺-, Dysprosium-Dy³⁺-, Eisen-Fe²⁺- und Fe³⁺-, Mangan-Mn²⁺-Ionen) richten sich bei einem äußeren Magnetfeld parallel zu diesem aus, so dass die Substanz selbst magnetisiert ist (positive Suszeptibilität). Sie sind durch ungepaarte Elektronenspins gekennzeichnet. Paramagnetische Substanzen bewirken - abhängig von ihrer Konzentration - entweder eine Verkürzung der Relaxationszeiten T1 oder T2, allerdings steht in den üblichen klinisch angewandten Dosen die Verkürzung der T1-Relaxationszeit im Vordergrund. Diese bewirkt in T1-gewichteten MR-Aufnahmen eine Signalerhöhung. Solche KM werden daher als "T1-Kontrastmittel" bezeichnet, die typischen Vertreter sind Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-BOPTA, Mn-DPDP. Während paramagnetische Substanzen in SE-Sequenzen kaum einen Einfluss auf die T2-Zeit haben, tritt dieser bei Anwendung von schnellen GE-Sequenzen stärker in den Vordergrund. Dies kann für Perfusionsmessungen genutzt werden: Die Gabe eines Kontrastmittelbolus mit folgender hoher KM-Konzentration im Blut bewirkt insbesondere in T2*-gewichteten GE-Aufnahmen eine deutliche Signalminderung in dem perfundierten Gewebe (181).

Superparamagnetische Substanzen haben demgegenüber einen wesentlichen Einfluss auf die T2-Relaxationszeit, indem sie diese signifikant verkürzen. Durch ein deutliches magnetisches Moment werden lokale Feldinhomogenitäten bewirkt, die Spins werden dephasiert und die T2-Relaxation wird beschleunigt (182). Bekanntester Vertreter der superparamagnetischen Verbindungen ist das Eisenoxid (Fe_3O_4). Zwischen solchen Partikeln und dem umgebenden Gewebe existiert eine große Suszeptibilitätsdifferenz, dies führt zu Magnetfeldgradienten auf mikroskopischem Niveau. Die Diffusion in diese Gradienten mit konsekutiv, irreversiblen Phasenkohärenzverlusten führt zusätzlich zu einer beschleunigten T2-Relaxation (183, 184, 185). Superparamagnetische Substanzen gelten als „T2-Kontrastmittel“. Allerdings darf dabei nicht vergessen werden, dass gerade Eisenoxide auch Einfluss auf die R1-Relaxivität haben. Verglichen mit den typischen paramagnetischen T1-Kontrastmitteln (Gd-DTPA) ist die R1-Relaxivität immer noch um den Faktor 2-10 stärker ausgeprägt. Sowohl paramagnetische als auch superparamagnetische Substanzen richten sich im äußeren Magnetfeld in Feldrichtung aus, wobei dieser Effekt bei Abschaltung des äußeren Magnetfeldes verloren geht, sie haben nicht die Wirkung einer permanenten Magnetisierung.

1. 2. Eisenoxide

1. 2. 1. Allgemein

Als Ausgangssubstanz für die Untersuchungen wurden superparamagnetische Eisenoxide benutzt. Eisenoxide sind eine neue Klasse von MR-Kontrastmitteln, die zunächst zur MR-Darstellung der Leber und Milz sowie später des lymphatischen Systems entwickelt wurden. Dabei wurde Fe_3O_4 als Grundsubstanz an Stabilisatoren wie Dextran, Carboxydextran, Albuminpolyäthylenglykol oder Stärke gebunden (186, 187, 188, 189, 182, 190). Die ersten MRT-Untersuchungen mit diesen Kontrastmitteln wurden Ende der 70er Jahre durchgeführt (191). Nach i.v. Injektion akkumulieren Eisenoxidpartikel je nach Größe und Struktur unterschiedlich lang im Blutsystem. Sie werden dann von den ortsständigen Makrophagen des RES in Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten intrazellulär aufgenommen (192, 193). Dies wird für die Diagnostik von neoplastischem Gewebe in diesen Organen ausgenutzt, da Tumoren diese Partikel nicht aufnehmen und somit von dem eisenhaltigen Organgewebe abgegrenzt werden können.

Mittlerweile existieren zahlreiche verschieden Präparationen von Eisenoxiden, von denen einige

bereits auf dem Markt und im klinischen Einsatz sind. Während ein Teil dieser Verbindungen aus einem einzelnen Eisenoxidkristall im Zentrum der Verbindung besteht („monokristallin“), enthalten andere Verbindungen multiple Kristallaggregate (Superparamagnetic-Polycrystalline-Iron-Oxides, SPIO, AMI-25 und Ultrasmall-Superparamagnetic-Polycrystalline-Iron-Oxides“, USPIO, AMI-227). Die zur Verfügung stehenden Eisenoxidpartikel unterscheiden sich neben der Beschaffenheit des Eisenkerns und der umgebenden Hülle insbesondere auch in ihrer Größe voneinander. Während SPIO einen Durchmesser von > 20 nm haben, ist der Durchmesser von USPIO < 20 nm. Die Partikelgröße reguliert insbesondere auch die Bluthalbwertszeit, denn die Zirkulation im Blut ist bei den kleineren Partikeln wesentlich länger (ca. 80 min. bei USPIO), verglichen mit den größeren Verbindungen (ca. 8 min. bei SPIO), in Abhängigkeit von der Spezies (in dem Fall bei der Ratte).

Klinisch kommen verschiedene Eisenoxidpräparate zur Zeit vor allem in der Leberdiagnostik zum Einsatz, wo sie zu einer Verbesserung in der Visualisierung von fokalen Leberläsionen führen (194, 195, 196, 197). Auch in der Milz wurde eine Verbesserung der Sichtbarmachung von Metastasen und Lymphomen beschrieben (198). Mit großen Hoffnungen sind Eisenoxide auch in der Lymphknotendiagnostik verbunden, wo sie eine Differenzierung von normalen und maligne infiltrierten Lymphknoten ermöglichen sollen (199). Darüber hinaus sind Eisenoxidpartikel klinisch auch zur Kontrastierung des Gastrointestinaltrakts untersucht worden (200).

Die Palette der experimentellen Studien, in denen Eisenoxide verwandt wurden, ist groß und kaum noch überblickbar. Hervorgehoben seien die Untersuchungen, in denen sich verschiedene Zelltypen (z.B. Tumorzellen und Lymphozyten) in unterschiedlichem Ausmaß mit Eisenoxiden unter in vitro Bedingungen markieren und anschließend kernspintomographisch visualisieren ließen (201, 202, 203). An einem Orchitismodell konnte gezeigt werden, dass sich in vitro markierte T-Zellen nach Reinjektion im Entzündungsareal wiederfinden und sich kernspintomographisch in vivo darstellen lassen (204). Auch Blutmakrophagen lassen sich mit USPIO in vitro markieren (205). Interessant sind auch Untersuchungen, in denen spezifische Liganden an Eisenoxide zur selektiven Aufnahme durch bestimmte Zellen gekoppelt wurden. Bei Kopplung an tumorspezifische Antikörper konnte ein spezifisches Enhancement der Tumoren mit der größten Anreicherung in der Region der höch-

sten Tumorzell-dichte gezeigt werden (206). Auch die Kopplung von Eisenoxiden an Liganden des ubiquitären Transferrinrezeptors führte zu einer verstärkten Internalisierung in Tumorzellen mit einer konsekutiv verbesserten Darstellbarkeit in der MRT (207). Anhand von so markierten USPIO ließ sich sogar die Expression des Transferrinrezeptors kernspintomographisch analysieren (208). Eine Kopplung an rezeptorspezifische Liganden steigert neben der Spezifität auch die Menge an USPIO, welche von den Zellen aufgenommen wird und einen Hauptfaktor zur Visualisierbarkeit in der MRT darstellt. Dieses Ziel verfolgend konnte die Anreicherung in Lymphozyten durch eine Konjugation mit dem tat-Protein des HI-Virus auf das Hundertfache des nicht konjugierten USPIO gesteigert werden (209).

1. 2. 2. Chemische Struktur von MION

In den eigenen Untersuchungen wurde, mit Ausnahme der im Kapitel 7 und 8 beschriebenen Experimente, als Modellpartikel eine monokristalline Dextraneisenoxidverbindung (MION, Monocrystalline-Iron-Oxid-Nanoparticle) benutzt, welche im Labor von R. Weissleder in Boston synthetisiert wurde. Für die Untersuchungen wurde die Charge MION-46 L verwandt. MION wurde durch alkalische Präzipitation von bivalentem und trivalentem Eisenchlorid (Sigma, St. Louis) in Gegenwart von hohen Konzentrationen Dextran (MW 1 kD; Pharmacia, Uppsala, Schweden; Verhältnis Dextran : Fe^{2+} : Fe^{3+} = 39,6 : 1,0 : 2,7) hergestellt. Da für den klinischen Einsatz brauchbare Eisenoxide wasserlöslich sein müssen, sind die wasserunlöslichen Magnetite (Fe_3O_4) und Ferrite ($\text{Fe}_2\text{M}_x\text{O}_4$; M = Metallion) nicht brauchbar. MION ist durch ein Eisen : Dextran-Verhältnis (in Mol) von 80:1 (gewichtsmäßig 27% Eisen und 57% Dextran) charakterisiert. Es besteht aus einem zentralen Eisenoxidkristall, welcher von einer Dextranhülle umgeben ist. Der Kerndurchmesser von MION ist $4,6 \text{ nm} \pm 1,2$ (mittlerer Durchmesser \pm Standardabweichung), bestimmt durch Elektronenmikroskopie

(Abb. 4).

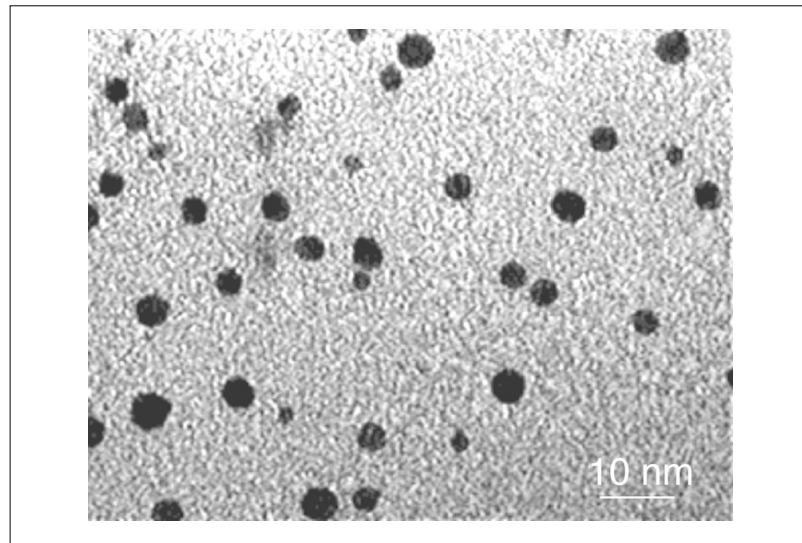


Abb. 4.: Elektronenmikroskopische Aufnahme von MION in Suspension

Jedes Partikel besteht aus einem einzigen Eisen-Kristall mit einem Durchmesser von weniger als 10nm.

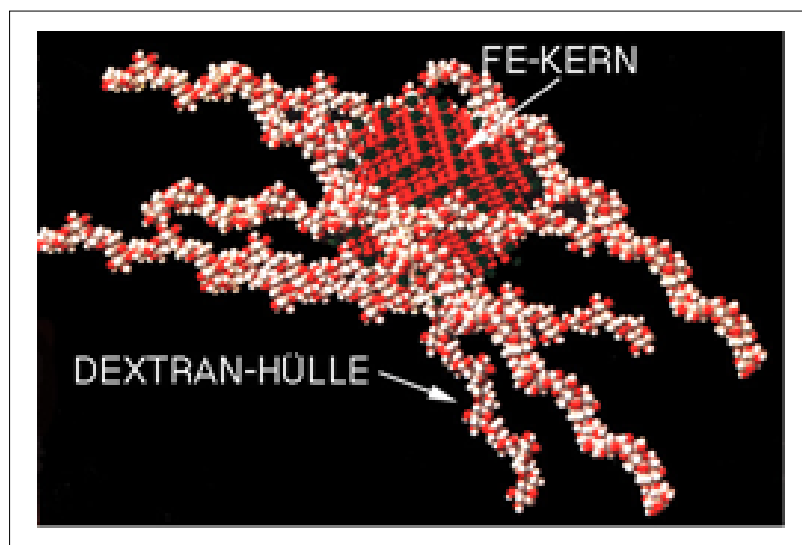


Abb. 5.: Modell von MION

Die Verbindung besteht aus einem zentralen Eisenkern und einer Hülle aus Dextranmolekülen.

Die MION-Präparationen haben eine stabile Dextranhülle, welche sich aus 20 – 30 Molekülen Dextran zusammensetzt (Abb. 5).

Diese Hülle schirmt den zentralen Eisenoxidkern von der Umgebung ab. Der hydrodynamische MION-Durchmesser beträgt ca. 20 nm, bestimmt durch dynamische Laserlicht-Streuung.

Die verwandten MION-Präparationen hatten eine gering negative Oberflächenladung. Nähere Details zu der angewandten MION-Präparation sind an anderer Stelle beschrieben (210).

1. 2. 3. Pharmakologische Eigenschaften von MION

Nach i. v. Injektion zirkuliert MION zunächst im Blut, MION-46 L hat bei der Ratte eine Blut-halbwertszeit von 4,5 hrs. Wie beschrieben akkumulieren die Eisenoxidpräparationen und hier auch MION in den Organen des RES. Hier erfolgt der Abbau in den Phagolysosomen, anschließend wird das elementare Eisen (vergleichbar mit dem Abbaumechanismus des Ferritins) in den körpereigenen Eisenpool aufgenommen. Studien mit radioaktiv markiertem Fe zeigten, dass nach 7 ds 14% und nach 50 ds 20% des Eisens aus injiziertem MION in Hämoglobin eingebaut sind (211).

Die Toxizität von Eisen und Eisenabkömmlingen wurde sehr intensiv untersucht. Im Zusammenhang mit Eisenoxiden konnte gezeigt werden, dass die für die MR-Tomographie benötigten Dosen nicht die für den Körper toxischen Dosen erreichen. Die normale Leber enthält 0,2 mg Fe/g Körpergewicht, der gesamte Eisenspeicher beinhaltet ungefähr 3,5 g Fe. Für einen 70 kg schweren Patienten werden, um für die MR-Bildgebung relevante Konzentrationen zu erreichen, ca. 70 – 140 mg Fe benötigt (212).

Bisher sind keine toxischen Nebenwirkungen oder eine Mutagenität von Eisenoxiden bekannt (193). Berichtet wird allerdings über kardiovaskuläre Nebenwirkungen, insbesondere über hypotone Krisen nach schneller Eisenoxidinjektion (189).

1. 2. 4. Magnetische Eigenschaften von MION

Mössbauer-Spektren der verwandten MION-46-Proben zeigten Spektren, welche sich bei abfallender Temperatur vom paramagnetischen bis hin zum magnetischen Bereich bewegten. Die Messung der Protonenrelaxation ergab Werte für die R2-Relaxation von 35 (l/mmol s) und für die R1-Relaxation von 16 (l/mmol s) (gemessen mit 0,47 T bei 37 °C).

2. Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke

2. 1. Fragestellung

Die BHS ist bei Gliomen in unterschiedlicher Weise beeinträchtigt. Beeinflussende Faktoren sind u. a. der Grad der Entdifferenzierung, die Gliomart, aber auch die Größe des Tumors. Allerdings haben gerade die infiltrierenden Tumorzellen fern der Tumormasse häufig noch eine intakte BHS und können so normalerweise nach intravenöser Injektion von KM nicht erreicht werden.

In dem Teilprojekt soll die Frage geklärt werden, in welchem Maße KM (hier Eisenoxide) in das Hirnparenchym mit primär intakter BHS gelangen, nachdem letztere artifiziell hyperosmotisch geöffnet wurde. Ferner soll der Frage nachgegangen werden, was die Nachweisbarkeitsgrenze für Eisenoxide im Gewebe ist, um diese mittels MRT zu visualisieren, wie sich experimentelle artifizielle BHS-Öffnungen auf die KM-Anreicherung im Gewebe auswirken und zu welchen Signalveränderungen dies in der MRT führt. Und nicht zuletzt, ob KM bei geöffneter Schranke von Zellen des Gehirns aufgenommen wird und, wenn ja, von welchen Zellen.

2. 2. Material und Methoden

2. 2. 1. Modell

Die BHS wurde artifiziell durch Injektion von hyperosmolarem Mannitol in die A. carotis interna temporär geöffnet, um Eisenoxide über die geöffnete Schranke in das Hirnparenchym zu bringen. Dazu wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (n = 40) (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Mass, USA) mit einem Gewicht von 250 bis 350 g durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital (Henry Schein, Port Washington, N.Y.) mit einer Dosis von 65 mg/kg anästhesiert. Um die BHS einseitig öffnen zu können, wurden Injektionen direkt in die A. carotis vorgenommen. Dazu wurden die rechte A. carotis externa und interna durch einen zervikalen ventro-lateralen Hautschnitt freigelegt. Die A. pterygopalatinae und proximale Äste der A. carotis externa wurden ligiert, ebenso die A. carotis externa 1cm distal der Bifurkation. Ein Yasargil-Klip wurde temporär am proximalen Teil dieser Arterie angebracht und ein Polyurethan-Katheter (PE 10) eingeführt und fixiert. Nach Entfernung des Klips wurde über diesen Katheter zunächst mittels eines Perfusors (Harvard Apparatus, South Nantucket, Mass, USA) 25%ige Mannitollösung (1,480 mOsm/l) bei 37° mit einer Flussrate von 0,12 ml/sec über insgesamt 30 Sekunden infundiert. Unmittelbar nach der Mannitol-Infusion wurde in denselben Katheter MION (25 - 50 mg Eisen

pro Ratte) injiziert. Bei einem Teil der Tiere war das injizierte MION radioaktiv markiert ($^{111}\text{Indium}$ oder ^{125}Jod). Die applizierte Eisenoxiddosis wurde aus methodischen Gründen so hoch gewählt, um Signalintensitätsveränderungen zu erzielen, die quantifiziert werden konnten. Nach Entfernung des Katheters wurde die A. carotis externa ligiert und die Haut verschlossen.

Anschließend wurden die Tiere kernspintomographisch untersucht (s. 2.2.2) und nachfolgend zuerst mit NaCl und dann mit Phosphat-gepuffertem Formalin perfundiert, um die Eisenoxide in den Gefäßen zu minimieren. Ein Teil der Tiere (n=5) wurde nicht perfundiert. Insgesamt 20 Tiere wurden 7 hrs nach MION-Injektion perfundiert, 12 Tiere 24 hrs nach Injektion, 6 Tiere 3 ds nach Injektion und 2 Tiere 9 ds nach Injektion. Die Radioaktivität in den entnommenen Gehirnen wurde mit einem Gammacounter (Wallak; Turku, Finnland) quantifiziert und als Anteil auf die injizierte Dosis bezogen. Um die geöffnete BHS zu demonstrieren wurde bei 2 ausgewählten Tieren 2 ml/kg einer 2%igen Evans-Blue-Lösung, die in 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst war, 5 Minuten vor Mannitol-Injektion zusätzlich injiziert.

2. 2. 2. MR-Technik

MR-Untersuchungen wurden in vivo (n=15) und ex vivo (n=25) durchgeführt. Für die ex vivo-Untersuchungen wurden die Gehirne, unmittelbar nachdem sie entnommen worden waren in Plastik-Röhrchen plziert, die mit Formalin gefüllt waren. Die Tiere wurden unmittelbar vor der Perfusion zu den entsprechenden Zeiten im MR untersucht (s. 2. 2. 1). Für die in vivo-MR-Untersuchungen wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital (65mg/kg) anästhesiert und auf einer Plexiglasplatte fixiert. Die MR-Untersuchungen wurden mit einem 1,5 - Tesla Magneten (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) durchgeführt, wobei eine 3-inch Oberflächenspule benutzt wurde. Es wurden koronare T1-gewichtete SE-Sequenzen (TR 300 msec, TE 17 msec, 256x192 Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schichtdicke), koronare Protonen- und T2-gewichtete SE-Sequenzen (TR 1500msec, TE 40/80 msec, 256x128 Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schichtdicke) und 3D GRE (TR 50 msec, TE 8 msec, Flipwinkel 60° , 256x192 Matrix, 8cm FOW, 0,7 cm Schichtdicke) gewählt.

2. 2. 3. Histologie

Unmittelbar nach der kernspintomographischen Untersuchung wurden die Tiere mit einer

Überdosis Phenobarbital getötet und anschließend zuerst mit NaCl (250ml), dann mit gepuffertem Formalin (250ml, 10%) perfundiert. Die entnommenen Gehirne wurden in Formalin nachfixiert. Zum Vergleich der MR-Bildgebung mit der Histologie wurden zwei Tiere nicht perfundiert, sondern durch eine Überdosis Phenobarbital getötet und die entnommenen Gehirne anschließend immersionsfixiert. Die Gehirne wurden mittels Vibratom in Serie in 200 µm dünne Scheiben geschnitten (Reichert-Jung, Nussloch, Germany). Es wurden entweder Eisenfärbungen nach Perls' angefertigt (Inkubation in 2% HCl und 2% Potassium Ferrozyanid) oder diese Eisenfärbungen wurden zusätzlich durch DAB (Inkubation für 30 Minuten in 0,5% Diaminobenzidin (DAB) mit 1% H₂O₂) verstärkt. Zur Auswertung auf lichtmikroskopischem Niveau wurden einige Gehirne in Paraffin eingebettet, in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und für Eisen gefärbt.

2. 2. 4. Autoradiographie

5 µm dicke in Paraffin eingebettete Schnitte wurden auf Gelatine-beschichteten Objektträgern (Baker, Philipsburg, NJ, USA) aufgezogen und mit den üblichen Methoden deparaffiniert. Die Schnitte wurden in „Molten Nuclear Emulsion“ (NTB-2; Eastmann Kodak, Rochester, NY, USA) bei 42° getaucht und bei 22° bis 25° C und 70- bis 80%-iger relativer Luftfeuchtigkeit für eine Stunde in einer Dunkelkammer getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte der Gehirne, welche mit In¹¹¹-MION injiziert wurden, für 2 Wochen in einer lichtundurchlässigen Box inkubiert. Nach der Entwicklung (Dektol; Eastman Kodak) wurden die Schnitte lichtgetrocknet und mit Kresyl-Violett oder Hämatoxilin Eosin für die Lichtmikroskopie gegengefärbt.

Um MION innerhalb des Gewebes zu quantifizieren, wurden Homogenisate von Hirngewebe, wie anderswo im Detail beschrieben (213), hergestellt. Für diese Homogenisate wurde Hirngewebe zerquetscht und dann für 2 Minuten bei 13,750g zentrifugiert. Die fetthaltige weiße Substanz, die nach Zentrifugation an der Oberfläche zu finden war, wurde vernichtet, die übrig gebliebene homogenisierte Masse wurde dann für die individuellen Standards benutzt. Zur Herstellung dieser Standards wurden 50 µl des Hirnhomogenisates mit 3 µl von ¹²⁵Jod-markiertem MION versehen, gut durchgemischt und erneut zentrifugiert. Jeder Standard wurde dann in Paraffin eingebettet und 20 µm dick geschnitten, auf von Gelatine bedeckte Objektträger aufgetragen und für die Autoradiographie vorbereitet. Die Autoradiographien der Hirnhomogenisat-Standards wurden bei einer Vergrößerung X 700 digitalisiert, die Körner pro Gesichtsfeld (Gesichtsfeld = 1 mm²) wurden

anschließend mittels Bildanalyse Software (NIH Image 1.55; National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA) ausgewertet. 5 Messungen wurden an repräsentativen Ausschnitten von jedem Schnitt durchgeführt; die Ergebnisse wurden gemittelt, um einen endgültigen Wert für die Anzahl der Körner/Gesichtsfeld zu erhalten. Auf diese Weise wurde für jeden Standard jeweils ein Wert erzielt, mit dem anschließend eine Kalibrierungskurve erstellt wurde. Dieser Auswertungsprozess wurde dann bei den Autoradiographien der experimentellen Hirnschnitte angewandt, die Kalibrierungskurve wurde benutzt, um die Menge von MION pro Volumen in jedem Schnitt zu bestimmen.

2. 2. 5. Bildanalyse

Ein wesentliches Ziel war es, die histologischen Schnitte mit den korrespondierenden MR-Bildern zu korrelieren. Ein Problem hierbei ist die unterschiedliche Schnittdicke und hier insbesondere die Tatsache, dass die MR-Schichten wesentlich dicker (die Schichtdicke betrug bei der SE-Sequenz 3mm, bei der 3-D GRE-Sequenz 0,7mm) als die histologischen Vibratom-Schnitte (200 μ m) sind. Obwohl die histologischen Färbungen theoretisch auch an den relativ dicken Schnitten durchgeführt werden könnten, ist diese Methode letztlich nicht anwendbar, da die Färbung bei solchen Schnitten nicht genug durch das fixierte Gewebe diffundiert und die letztendliche Eisenmenge im Gewebe unterbewertet wird. Deshalb wurde jede der 15 eisengefärbten histologischen Schnitte (200 μ m) individuell digitalisiert und dann digital virtuell wieder zusammengesetzt. So wurden 3 mm dicke "Maps" erhalten, welche mit dem korrespondierenden MR-Bild korreliert werden konnten. Um die histologischen Schnitte übereinander zu legen, wurden charakteristische anatomische "Landmarken" markiert und diese Schnitte dann anhand dieser Marken virtuell übereinander gelegt. Auf diese Weise repräsentiert die histologische "Map" quantitativ eine räumliche Auflösung, welche einem 3 mm dicken MR-Schnitt entspricht.

Die autoradiographischen Bilder wurden in gleicher Weise erhalten und digitalisiert. Die digitalisierten Bilder wurden dann in Isotopenkonzentrationen unter Heranziehung der bekannten Standards umgewandelt. Alle MR-Bilder wurden anschließend analysiert, insbesondere wurden Regionen, welche Eisensignale zeigten, markiert. Die MR-Bilder wurden mit den histologischen Maps verglichen und die geringste Menge an Eisenoxid bestimmt, welche kernspintomographisch nachweisbar war.

2. 3. Ergebnisse

2. 3. 1. Quantifizierung

Es zeigte sich, dass nach intravenöser Injektion durchschnittlich $0,2 \% \pm 0,12$ des injizierten MION (0,024 bis 0,25 mg Eisen, entsprechend einem Durchschnitt von 0,071 mg Eisen pro Gehirn), die osmotisch geöffnete BHS 24 hrs passierten und sich im Gehirn ablagerten. Die semiquantitative Autoradiographie erbrachte Eisenkonzentrationen zwischen 4,3 mg Fe/mm³ in der BHS-geöffneten Hemisphäre und 0 mg Fe/mm³ in der kontralateralen Hemisphäre. Dies entsprach 860 ng Fe/mm² in einem 200 µm dünnen histologischen Schnitt. In der SE-Sequenz (1500/40) war die kleinste Menge MION, welche im Gehirn kernspintomographisch nachgewiesen werden konnte, 0,77 mg Fe/mm³. Dies entspricht 154 ng Fe/mm² in einem 200 µm dicken histologischen Schnitt oder 2,31 mg Fe in einem 3 mm dicken MR-Schnitt. In der GRE 50/6 -Sequenz (60° Flipwinkel, 700 µm Schnittdicke) betrug die geringste Konzentration, die mittels MR-Bildgebung nachgewiesen werden konnte, 88,9 ng Fe/mm³. Dies entspricht 17,8 ng Fe/mm² in einem 200 µm dicken histologischen Schnitt oder 62,2 ng Fe/mm² in einer 0,7 µm dicken MR-Aufnahme (225).

2. 3. 2. Korrelation der MR-Bildgebung mit der Histologie

Alle Gehirne zeigten in der T2-Wichtung (SE 1500/40) nach einseitiger BHS-Öffnung und folgender MION-Injektion charakteristische Änderungen der Signalintensität. Das Ausmaß der Veränderungen variierte von Tier zu Tier. Bei einigen Tieren zeigten sich nur fokale Signaländerungen in der ipsilateralen Hemisphäre, bei anderen Tieren zeigten sich in der gesamten Hemisphäre signifikante Signalveränderungen. Die stärksten Signalveränderungen zeigten sich immer kortikal, subkortikal und im Hirnstamm, wechselnde Veränderungen zeigten sich im Nucleus caudatus und im Putamen. Keine oder nur geringe Signalveränderungen zeigten sich in einigen Regionen, wie z. B. dem Corpus callosum. Signalveränderungen in der kontralateralen Hemisphäre, in denen die BHS nicht artifiziell durchbrochen war, wurden gelegentlich im Bereich des Gyrus cinguli, Thalamus, Corpus callosum und in Teilen des Hirnstammes gefunden, bedingt durch kollaterale Blutversorgung von der gegenüberliegenden Seite.

Quantitative histologische Maps der räumlichen Eisenoxidverteilung innerhalb des Gehirns korrelierten sehr eng mit der MR-Bildgebung (Abb. 6).

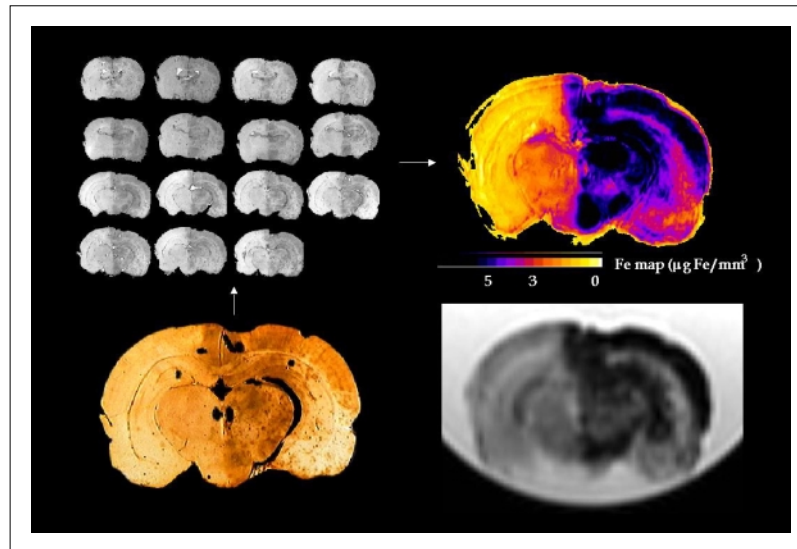
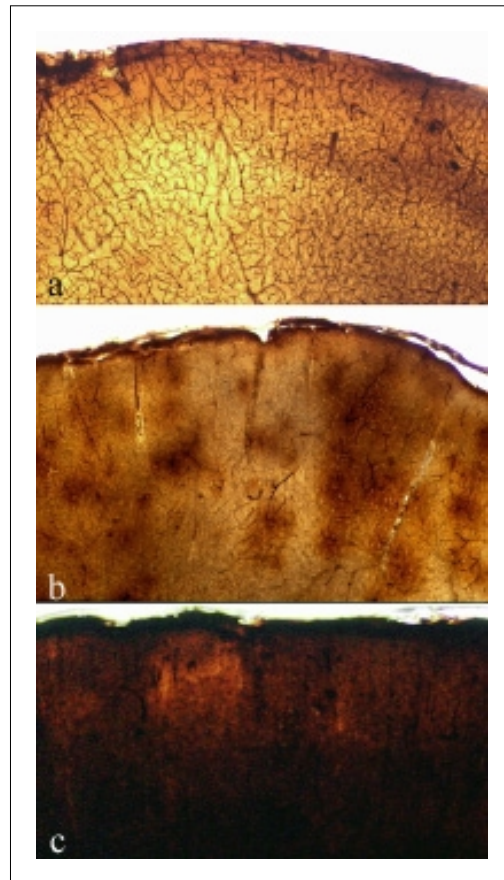


Abb. 6.: Korrelation der MRT mit dem histologischen Mapping

Gehirn nach experimenteller Schrankenöffnung durch Mannitolinjektion und folgender MION-Applikation in die linke A. carotis interna. Individuelle Vibratomschnitte (200 µm) wurden für Eisen gefärbt, das Eisen erscheint als dunkelbraunes Pigment (links unten). Eine Serie von solchen histologischen aneinander gereihten Schnitten wurde digitalisiert und in S/W-Skalen umgewandelt (oben links). Daraus wurde ein künstliches Projektionsbild gewonnen und dieses mit autoradiographischen Methoden für Eisenkonzentrationen im Gewebe pro mm³ kalibriert (oben rechts). Dieses Bild entspricht mit 3 mm der Schnittdicke des entsprechenden MR-Bildes. Das MRT (unten rechts, SE 1500 / 40) korreliert gut mit dem Histologie-Mapping, das Parenchym weist Eisenkonzentrationen von 0 bis 4,3 µg / mm³ auf. Die höchsten Eisenkonzentrationen lassen sich im Kortex der linken Hirnhemisphäre finden.

Eine enge Korrelation fand sich aber auch zwischen der Evans Blue-Verteilung am histologischen Schnitt und den durch Eisenoxide bedingten MR-Signalveränderungen. Entsprechend den Signalveränderungen in der MRT wurden die höchsten Eisenoxidkonzentrationen kortikal, subkortikal und in Teilen des Hirnstammes der ipsilateralen Hemisphäre gefunden mit geringeren Eisenmengen in den tieferen Hirnstrukturen. So gut wie keine Eisenoxide wurden im Kortex und in den tieferen Hirnstrukturen der kontralateralen Hemisphäre gefunden. Das beschriebene Muster in der Verteilung der Eisenoxide und auch der entsprechenden Signalveränderungen in der MRT lässt sich mit der bevorzugten artifiziellen BHS-Öffnung in den Hirnregionen erklären, die eine hohe Blutperfusion aufweisen.

Inwieweit die BHS durchbrochen war und sich dementsprechend Eisenoxide im Gehirn anreicherten, variierte von Gehirn zu Gehirn auch bei identischem Untersuchungsprotokoll. Die artifizielle Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke war entweder mehr fokal (n=29) oder diffus (n=11) erfolgt (Abb. 7).

**Abb. 7.: Formen der BHS-Öffnung**

MION-Injektion nach experimenteller BHS-Öffnung. DAB-modifizierte Eisenfärbung eines 150 µm dicken Vibratomschnittes. In der kontralateralen Hemisphäre sind die Gefäße mit Eisen gefüllt (**a**). In der mit Mannitol injizierten Hemisphäre zeigt sich entweder eine partielle BHS-Öffnung mit Übertritt der Eisenoxide in das Hirnparenchym (**b**) oder eine komplette BHS-Öffnung mit ausgeprägter und diffuser Anfärbung des gesamten Hirnparenchyms mit Eisenpartikeln (**c**).

Große Eisenoxidansammlungen und entsprechende Signalveränderungen wurden immer z. B. im Plexus choroideus oder in der Hypophyse gefunden, hauptsächlich zu erklären mit der in diesen Regionen fehlenden BHS. Auf zellulärem Niveau wurden Eisenoxide bei erfolgter artifizierter Schrankenöffnung hauptsächlich in aktivierter Mikroglia, aber auch in Astrozyten und in Neuronen des Kortex gefunden, wo es sich hauptsächlich im Zytoplasma des Zellkörpers und in Dentriten befand. (Abb. 8).

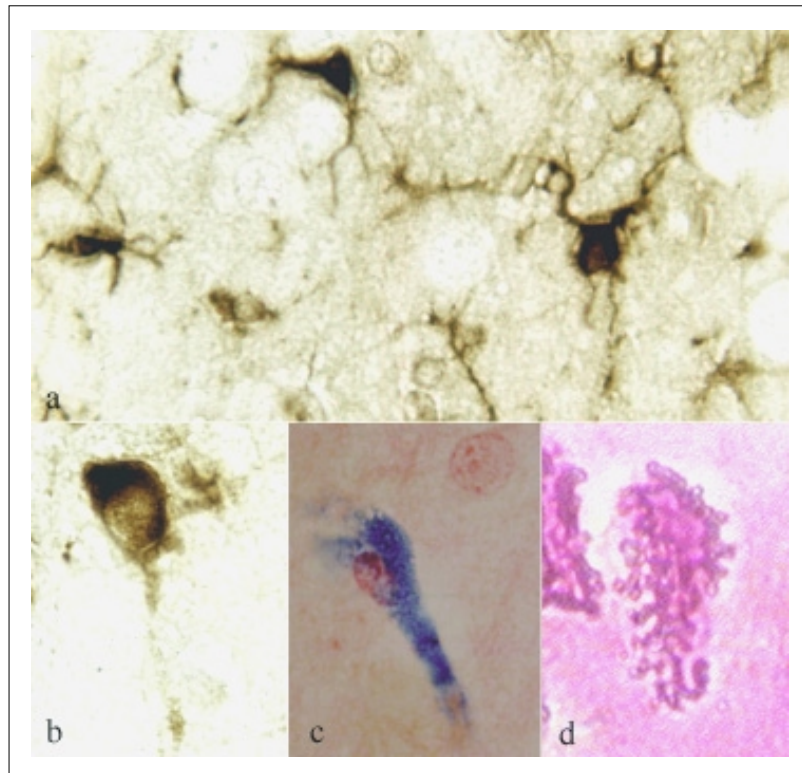


Abb. 8.: Intrazelluläre MION-Aufnahme nach BHS-Öffnung

Nach erfolgter BHS-Öffnung werden Eisenoxide im großen Maße von aktivierter Mikroglia aufgenommen (DAB verstärkte Perls-Färbung) (a). Darüber hinaus zeigen sich Eisenoxide aber auch im geringeren Maße in anderen Zellen, so im Zytoplasma von Neuronen (DAB verstärkte Perls-Färbung) (b). Dies zeigt sich auch in einer einfachen Perls-Färbung (c) und autoradiographisch durch Aufnahme von ^{111}In -MION in das Zytoplasma (d).

Ferner wurden Eisenoxide zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt im Zellinterstitium gefunden, bei einer späteren histologischen Aufarbeitung nach Injektion ließen sich solche interstitiellen Eisenoxidansammlungen nicht mehr beobachten.

2. 3. 3. Auswirkung der Pulssequenz auf die Signalintensität

SE-Sequenzen (1500/40) gaben am genauesten den tatsächlichen Eisenoxidgehalt innerhalb des Gehirns wieder, demgegenüber tendierten mehr T2-gewichtete SE-Sequenzen (1500/80) zu einer Überbetonung der Größe dieser Regionen. Im Vergleich dazu zeigten Signalintensitätsveränderungen in T1-gewichteten Sequenzen eine charakteristische biphasische Abhängigkeit von der Eisenkonzentration. Bei lokalen Konzentrationen von weniger als 10 mg Fe/mm² in einem 3 mm dicken Schnitt war die Signalintensität, verglichen zum normalen Gehirn, hyperintens.

Demgegenüber kam es bei höheren lokalen Konzentrationen ($>10 \text{ mg Fe/mm}^2$ in einem 3 mm dicken Schnitt) zu einer hypointensen Signalintensität, verglichen mit dem normalen Gehirn (Abb. 9 a und b).

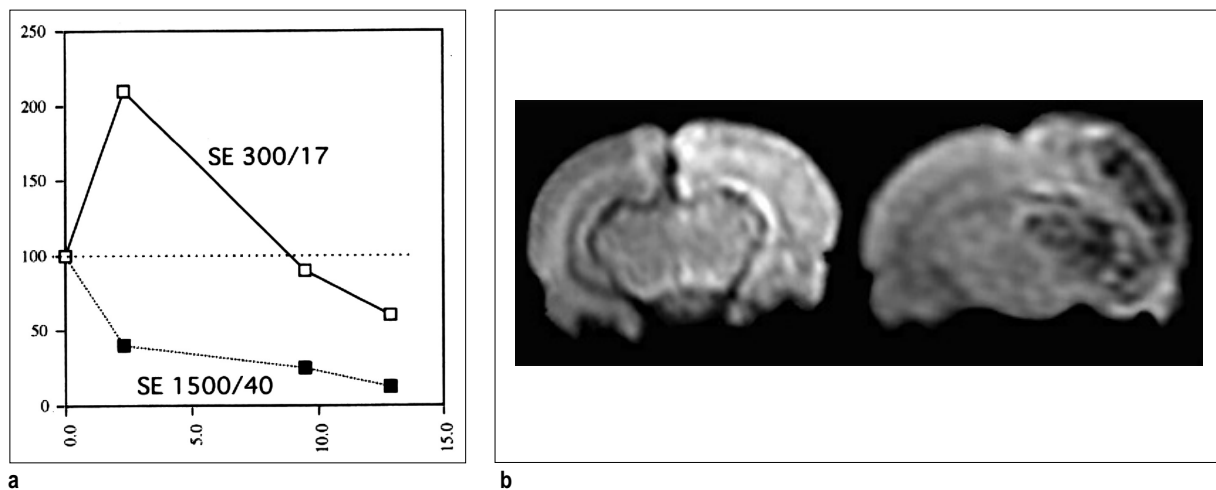


Abb. 9.: MR-Signalintensitätsänderung als Folge der Eisenoxidkonzentration

Signalintensitätsänderung (in %, X-Achse), Eisenkonzentration ($\mu\text{g Fe/mm}^3$, Y-Achse). In T1w-Sequenzen (SE 300/20) bei niedrigen Eisenkonzentrationen initialer Signalanstieg, mit zunehmender Eisenkonzentration dann Abfall der Signalintensität. In T2w-Sequenzen (SE 1500/40) mit zunehmender Eisenkonzentration kontinuierlicher Abfall der Signalintensität sogar bei niedrigen MION-Konzentrationen (a). In T1w-Sequenz (SE 300/17) zeigt die BHS-geöffnete linke Hemisphäre bei niedrigen Eisenkonzentrationen eine erhöhte Signalintensität (links), eine erniedrigte Signalintensität bei höheren MION-Konzentrationen (rechts) (b).

Signalveränderungen in 3 D GRE-Sequenzen beanspruchten, sogar bei niedrigen Eisenkonzentrationen, häufig die gesamte Hemisphäre und führten zu einer deutlichen Überbetonung der Größe von Regionen, die histologisch Eisenansammlungen aufwiesen. Dies erklärt sich mit dem starken Suszeptibilitäts-Effekt von Eisenoxiden („Blooming- Artefakt“) (Abb. 10).

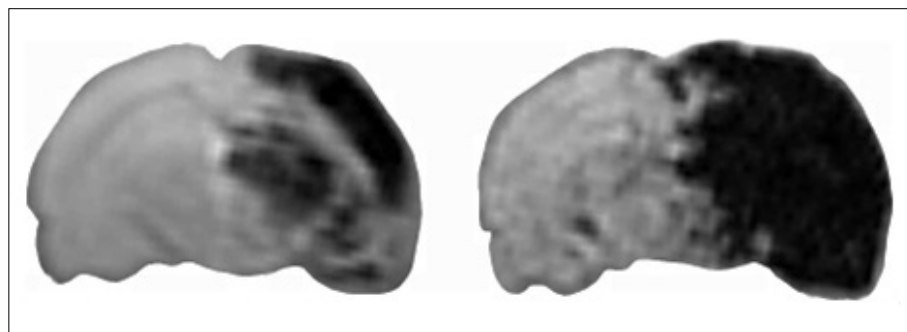


Abb. 10.: Vergleich zwischen einer SE- und einer GRE-Sequenz

Die Signalveränderungen unterscheiden sich in den angewandten Sequenzen. Verglichen mit der durchgeführten Histologie zeigt sich bei der GRE-Sequenz (rechts) eine deutliche Überbetonung der eigentlichen abgelagerten Eisenoxidsmenge im Gewebe („Blooming-Artefakt“). Die SE-Sequenz (links) entspricht der realen Eisenoxidverteilung.

Allerdings sind GRE-Sequenzen insbesondere dann sehr nützlich, wenn es darum geht, die kleinsten Eisenoxidansammlungen innerhalb des Gehirns nachzuweisen.

2. 3. 4. Zeitlicher Verlauf der Signalveränderungen und der Eisenoxidablagerungen

Die Experimente wurden 7 hrs (n= 20), 24 hrs (n= 12), 3 ds (n= 6) und 9 ds (n= 2) nach artifizierter Öffnung der BHS durchgeführt. Bei allen Tieren, die kernspintomographisch 7 hrs nach Öffnung der BHS untersucht wurden, waren die Signalveränderungen identisch mit denen, welche 24 hrs nach BHS-Durchbrechung untersucht wurden. 7 hrs nach Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke waren noch große Eisenoxidansammlungen in den Blutgefäßen sowohl der geöffneten als auch der nicht geöffneten Hemisphäre zu finden. Bei den Tieren, die 3 ds nach erfolgter Schrankenöffnung und MION-Injektion untersucht wurden, zeigten sich nach wie vor Signalveränderungen, wenngleich diese Signalveränderungen deutlich schwächer als nach 24 hrs waren. 9 ds nach MION-Injektion konnten keine signifikanten Signalveränderungen mehr beobachtet werden (Abb. 11).

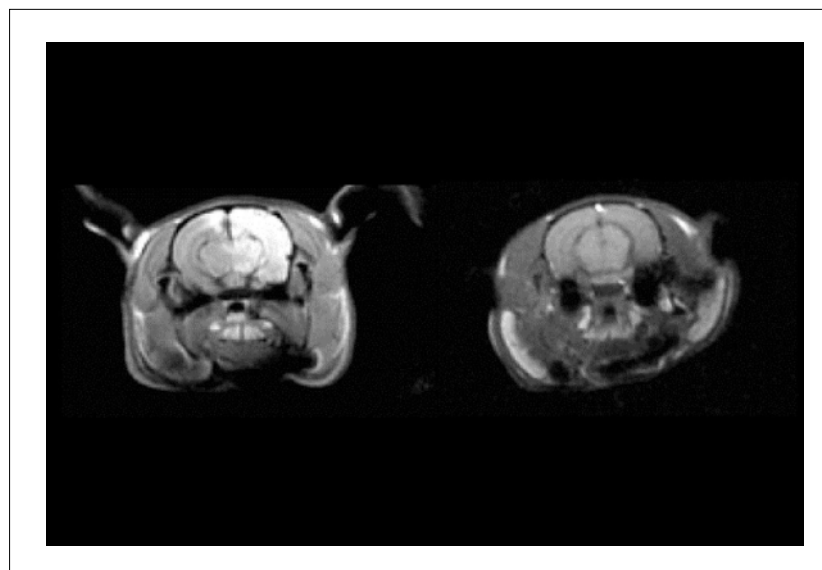


Abb. 11.: Zeitverlauf der Signalveränderungen

12 Stunden nach erfolgter BHS-Öffnung mit folgender MION-Injektion zeigen sich ausgeprägte Signalveränderungen in der linken Hemisphäre (links), nach neun Tagen sind keine Signalveränderungen mehr zu erkennen (rechts).

Auch histologisch ließ sich 9 Tage nach Eisenoxidinjektion, außer in den Regionen, welche physiologischerweise hohe Eisenkonzentrationen besitzen (Globus pallidum, Substantia nigra und Nucleus dentatus), kein Eisen mehr nachweisen.

2. 3. 5. Vergleich der *in vivo* mit der *ex vivo* MR-Bildgebung

MR-Bildgebung wurde sowohl *ex vivo* (n=25) als auch *in vivo* (n=15) durchgeführt, wobei die Signalveränderungen zwischen diesen beiden Modalitäten ähnlich waren.

Die *ex vivo* Bildgebung resultierte in einer besseren Demarkation der Regionen mit Eisenoxidablagerungen. Die schärfere Demarkierung der Regionen mit abgelagerten Eisenoxiden lässt sich durch die fehlenden Suszeptibilitätsartefakte des Knochens, die fehlenden Bewegungsartefakte und durch die Möglichkeiten, Signale durch längere Untersuchungszeiten zu erhöhen, erklären. Bei den *in vivo* Untersuchungen war die Unterscheidung zwischen grauer und weißer Substanz wesentlich deutlicher, hauptsächlich bedingt durch die unterschiedliche zerebrale Perfusion in diesen Hirnarealen (Abb. 12).

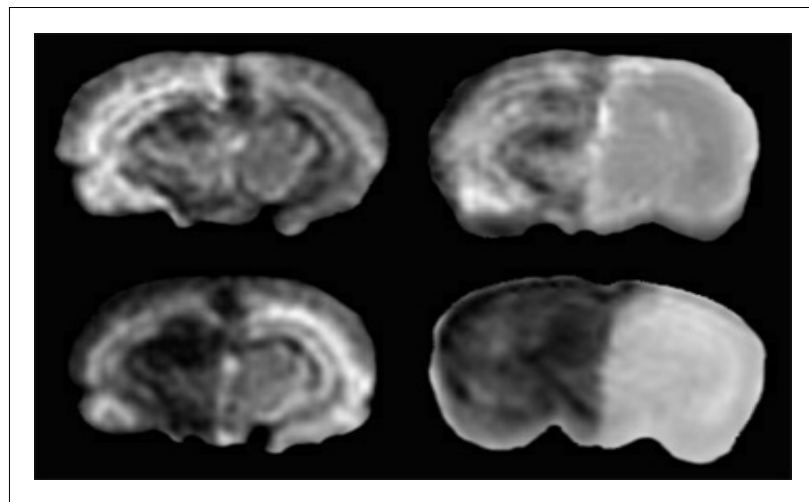


Abb. 12.: Vergleich zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-MRT nach BHS-Öffnung

Die rechte Reihe zeigt die *ex vivo* MRT, die linke Reihe die *in vivo* MRT (oben T1w, unten T2w). Hauptsächlich bedingt durch die fehlende Blutzirkulation zeigen sich bei den *ex vivo* MR-Untersuchungen weniger anatomische Details. Andererseits ist die Demarkierung des eisenbedingten Signalverlustes *ex vivo* stärker ausgeprägt.

2. 4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Eisenoxidverbindung MION über eine geöffnete BHS transportiert werden kann, dass MION dann nicht nur extrazellulär abgelagert, sondern größtenteils von aktivierter Mikroglia, in geringerem Maße aber auch von Astrozyten und Neuronen aufgenommen wird und dass die hervorgerufenen Signalveränderungen in der MRT (insbesondere bei

SE-1500/40-Sequenzen) sowohl in der Sensitivität, als auch in der Verteilung mit histologischen Eisenoxid-Maps korrelieren. Auch ließ sich zeigen, dass die Nachweisbarkeitsgrenze, um Eisenoxide mittels MRT zu visualisieren, bei ungefähr 62,2 ng Eisen/mm³ unter Verwendung einer 3D-GRE-Technik liegt. Die MION-Ablagerung/-Anreicherung innerhalb des Gehirns zeigte ein charakteristisches Erscheinungsbild mit hoher Akkumulationen hauptsächlich in der Hemisphäre, in der die BHS artifiziell geöffnet worden war, und hier besonders in den Regionen des höchsten zerebralen Blutflusses (Kortex).

Um Tumorgewebe mit spezifischen Kontrastmittelkonjugaten zu erreichen, ist eine Überwindung der BHS/BTS notwendig. Diese ist bei Tumoren unterschiedlich durchlässig und variiert auch innerhalb des einzelnen Tumors. Malignität, Tumorart und Größe des Tumors sind beeinflussende Parameter. Zur Überwindung der BHS/BTS bieten sich im wesentlichen drei Möglichkeiten:

- a.) Injektion der Konjugate direkt in die Tumormasse,
- b.) artifizielle temporäre BHS-Öffnung,
- c.) Rezeptor-vermittelter Transport.

Die artifizielle osmotische Öffnung der BHS mittels hypertonen Lösungen wie Mannitol ist eine gut etablierte Methode, die gelegentlich auch klinisch meist zur Verabreichung von therapeutischen Pharmaka (z. B. Chemotherapie bei Hirntumoren) eingesetzt wird. (215, 216). Mannitol bewirkt temporär eine hyperosmotisch bedingte Schrumpfung der Gefäßendothelien und damit eine vermehrte Permeabilität durch die Gefäßendothelien. Diese osmotische Schrankenöffnung ist temporär, sie hat ihren Höhepunkt ca. 15 Minuten nach Mannitol-Injektionsbeginn und ist 2 hrs nach Injektion beendet (217). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass eine solche temporäre BHS-Öffnung geeignet ist, um auch diagnostische Pharmaka, wie Eisenoxide (MION, 20 nm im Durchmesser) in das Hirnparenchym zu transportieren. Erstaunlich ist jedoch, dass trotz direkter Injektion in die Arteria carotis nur 0,2 % der injizierten Dosis letztlich im Gehirn nachgewiesen werden konnten. Die quantitative Verteilung der Eisenoxide im Hirnparenchym korreliert dabei weitgehend mit der zerebralen Durchblutung. Stark vaskularisierte Gebiete wie der zerebrale Kortex zeigen eine wesentlich höhere Eisenoxidaufnahme, verglichen mit nicht so stark vaskularisierten

Regionen, z. B. der weißen Substanz. Ist MION über die BHS in das Hirnparenchym gelangt, so wird es im wesentlichen von aktivierter Mikroglia intrazellulär aufgenommen. Dass die Öffnung der BHS zu einer Aktivierung von Mikroglia und damit Umwandlung der ruhenden Mikroglia in eine phagozytotisch aktive Zelle führt, ist bekannt (218). Neben der intrazellulären Aufnahme in Mikroglia, lässt sich intrazellulär Eisenoxid jedoch auch in geringerem Maße in Neuronen und Astrozyten finden, wobei es ausschließlich im Zytoplasma der Zellen zu finden ist. Dies steht im Einklang mit Hinweisen darauf, dass der Eisenoxiddkatabolismus innerhalb der Zelle im lysosomalen Kompartiment der Zellen stattfindet (219), ähnlich dem bekannten Abbauweg für zerebrales Eisen (220). Auch die Tatsache, dass 9 Tage nach der experimentellen Schrankenöffnung mit folgender intraarterieller MION-Injektion nur mehr geringste Eisenoxidgehalten im Gehirn nachweisbar sind, spricht für einen sehr effektiven katabolen Abbau.

Die MR-Morphologie des Gehirns nach experimenteller Schrankenöffnung und intraarterieller MION-Injektion ist komplex und abhängig von der MION-Konzentration, der angewandten Pulssequenz und dem Zeitpunkt der Untersuchungen in Bezug zur MION-Injektion. Die MION-Konzentration im Blut erklärt sich aus den pharmakokinetischen Daten, der zerebralen Hämodynamik und der Pathophysiologie der BHS. Zu dem frühesten Untersuchungszeitpunkt nach MION-Injektion (7 hrs) fanden sich noch große Mengen von Eisenoxiden im Blut (die Bluthalbwertszeit für MION beträgt ca. 4,5 hrs). Die Signalveränderungen zeigten sich zum größten Teil in der ipsilateralen Hemisphäre mit nur diskreten Veränderungen in der kontralateralen Hemisphäre, bedingt durch die bekannt starke Kollateralisierung bei der Ratte. Die größten Signalveränderungen zeigten sich in den kortikalen und subkortikalen Strukturen, bedingt durch die relativ hohe Perfusion in diesen Gebieten, geringere Signalveränderungen ließen sich in weniger gut perfundierten Regionen der weißen Substanz nachweisen. 24 hrs nach MION-Gabe (entsprechend mehr als 5 Bluthalbwertszeiten von MION) waren die Signalveränderungen davon abhängig, welche Pulssequenz gewählt wurde. Am dichtesten mit der Histologie korrelierten Protonen-gewichtete Sequenzen (SE-1500/40). Mit dieser Sequenz stellten sich die Eisenoxide hypointens dar, dadurch war die Interpretation dieser Bilder einfach. Im Gegensatz dazu zeigten die T1-w Sequenzen (SE-300/17) einen charakteristischen biphasischen Verlauf hinsichtlich der Signalintensität mit hohen Signalintensitäten bei niedrigen Eisenkonzentrationen ($> 10 \text{ mg Fe/mm}^2$ in einer 3 mm dicken

Schicht) und niedrigen Signalintensitäten bei hohen Eisenkonzentrationen ($< 10 \text{ mg Fe/mm}^2$ in einem 3 mm dicken Schnitt). 3D-GRE Sequenzen betonen deutlich den wahren Gehalt an Eisenoxiden über („Blooming“).

3. MR-Bildgebung von experimentellen Gliomen

3. 1. Fragestellung

In dem vorliegenden Teilabschnitt soll die Frage geklärt werden, wie sich experimentelle Gliome nach intravenöser Eisenoxidgabe kernspintomographisch darstellen lassen und was das histomorphologische Korrelat dieser Signalveränderungen ist. Darüber hinaus soll untersucht werden, wie sich diese Signalveränderungen im zeitlichen Verlauf entwickeln; ferner soll die Eisenoxid-Schwellendosis ermittelt werden, die ausreichend ist, um mit geeigneten Sequenzen noch Signalveränderungen im Tumor hervorzurufen.

3. 2. Material und Methoden

3. 2. 1. Modell

Männliche F-344-Ratten (n=13, Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA, USA) mit einem Gewicht zwischen 200-300 g wurden mit Phenobarbital (65 mg/kg; Henry Schein, Inc., Port Washington, NY, USA) anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) fixiert. Nach einem Hautschnitt im Bereich der Mittellinie über dem Bregma wurde ein Bohrloch in die Kalotte 0,5 mm posterior und 3,5 mm lateral des Bregmas angelegt und mit einer 10 µl Spritze (Hamilton, Reno, NY, USA) 5 µl der C6- bzw. der 9L-Zellsuspension (10^6 Zellen in DMEM) in das Putamen in einer Tiefe von 4 mm von der Dura entfernt injiziert. C6 ist eine Gliom-Zelllinie (221), 9L eine Gliosarkom-Zelllinie (222), die beide primär chemisch induziert wurden. Es wurde eine C6-Zelllinie benutzt, welche transfiziert war und β -Galaktosidase exprimierte (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von X. O. Breakfield, Molecular Neurogenetics Unit, Neuroscience Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Die 9L-Zelllinie wurde vom Brain Tumor Center, University of California, San Francisco, USA zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten injiziert und die Nadel über denselben Zeitraum hinweg zurückgezogen. Das Bohrloch wurde mit Knochenwachs (Ethicon, Inc., Sommerville, NJ, USA) verschlossen und die Haut genäht.

3. 2. 2. MR - Technik

10 bis 14 ds nach der Tumorimplantation wurden die Tiere kernspintomographisch untersucht. Alle Tiere wurden zunächst ohne Kontrastmittel und später 12 hrs nach intravenöser Injektion von

2mg (n=2), 4 mg (n=2, 10 mg (n=5) oder 20 mg (n=2) Fe/kg MION oder Kochsalz (n=2) kernspintomographisch untersucht. Drei Tiere, welche 10mg Fe/kg MION erhalten hatten, wurden im Verlauf 1, 6, 12, 24 und 72 hrs und noch einmal fünf ds nach Injektion kernspintomographisch untersucht.

Für die MR Untersuchungen wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital (65 mg/kg) anästhesiert und auf einer Plexiglasplatte fixiert, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Die MR-Untersuchungen wurden mit einem 1,5 -Tesla Magneten (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) durchgeführt, wobei eine 3-inch-Oberflächenspule benutzt wurde. Es wurden koronare T1-gewichtete SE-Sequenzen (TR 300 msec, TE 17 msec, 256x192 Matrix, 8 cm FOV, 3 mm Schnittdicke), koronare Protonen- und T2-gewichtete SE-Sequenzen (TR 1500 msec, TE 40/80 msec, 256x128 Matrix, 8 cm FOV, 3 mm Schnittdicke) und 3 D Grass-Sequenzen (TR 60 msec, TE 20 msec, Flipwinkel 20°, 256x192 Matrix, 8 cm FOW, 0,7 cm Schnittdicke) gewählt.

3. 2. 3. Histologie

Unmittelbar nach der kernspintomographischen Untersuchung wurden die Tiere mit einer Überdosis Phenobarbital getötet und anschließend zuerst mit Kochsalz (250 ml), dann mit gepuffertem Formalin (250 ml, 10%) perfundiert. Die entnommenen Gehirne wurden über Nacht in Formalin nachfixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 6 µm dünne Scheiben geschnitten (Reichert-Jung, Nussloch, Germany). Es wurden Eisenfärbungen nach Perls' angefertigt (Inkubation in 2% HCl und 2% Potassium Ferrozyanid) mit zusätzlicher Verstärkung durch DAB (Inkubation für 30 Minuten in 0,5% Diaminobenzidin mit 1% H₂O₂) und Kernechtrot-Gegenfärbung (223). Histologisch sind singuläre Tumorzellen im normalen Hirnparenchym oft nicht eindeutig zu erkennen. Da die Zellen der angewandten transfizierten Zelllinie im Gegensatz zu normaler Glia β-Galaktosidase exprimieren, wurde dies als Markerenzym zur Identifizierung singulärer Tumorzellen benutzt. Dazu wurden ausgewählte Hirne nicht in Paraffin eingebettet, sondern tiefgefroren und anschließend im Kryostat in 6 µm dicke Scheiben geschnitten und histochemisch unter Benutzung von X-Gal-Substrat gefärbt (224). β-Galaktosidase exprimierende Tumorzellen zeigen sich blau gefärbt, während normale Glia ungefärbt bleibt.

3. 3. Ergebnisse

3. 3. 1. MR-Morphologie

Es wurde untersucht, wieweit intravenöse Eisenoxidinjektionen zeit- und konzentrationsabhängig spezifische MR-Signalveränderungen in experimentellen Hirntumoren (C6, 9L) hervorrufen. Verschiedene MR-Sequenzen (SE, GE) wurden gewählt.

Präkontrastaufnahmen zeigten Tumoren in einer Größe zwischen 3 und 8 mm im Durchmesser. Während die C6-Tumoren von runder Form waren und ausschließlich im Putamen wuchsen, waren 9L-Tumoren meist oval und wuchsen primär im Stichkanal bis zur Leptomeninx, in fortgeschrittenem Stadium infiltrierten sie sogar die Schädelkalotte. In T1-gewichteten Aufnahmen (SE 300/17) stellten sie sich homogen hypointens, in T2- oder Protonen-gewichteten Aufnahmen (SE 1500/40,80) hyperintens zum umgebenden Gewebe dar. Größere Tumoren waren in der Regel heterogener im Signalverhalten mit T1 schwach hypointensem Tumorzentrum (Nekrose). In der T2-Wichtung war in der Regel ein geringes peritumorales Ödem zu sehen.

Die intravenöse MION-Gabe resultiert in einem charakteristischen ringförmigen Erscheinungsbild der großen Tumoren (Abb. 13).

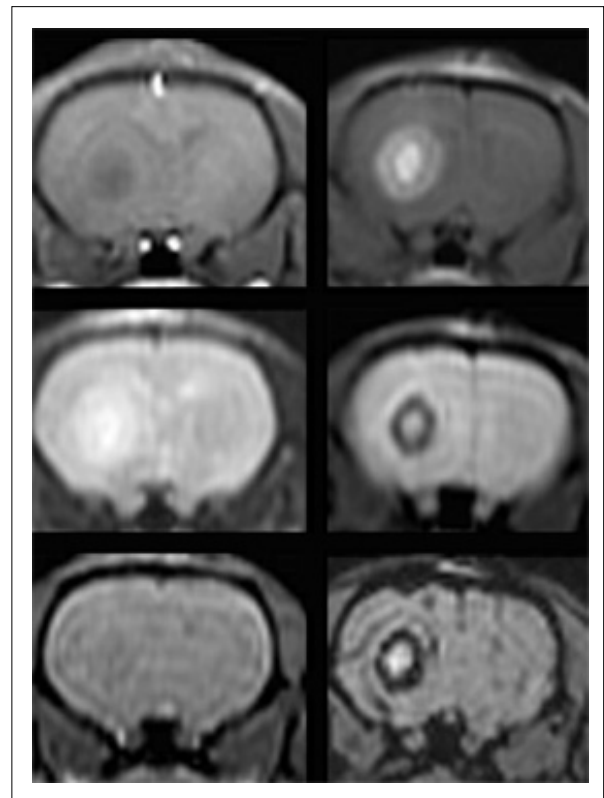


Abb. 13.: MRT des C6-Glioms bei hoher MION-Konzentration

Typisches ringförmiges Erscheinungsbild von größeren Gliomen nach MION-Injektion. Obere Reihe T1w SE (300/17). Mittlere Reihe T2w SE (1500/40). Untere Reihe GRE 60/20. Vor (links) und 24 hrs nach (rechts) Injektion von 10 mg Fe/kg MION.

In T2-gewichteten SE- und GRE-Sequenzen stellen sich zellarme Tumorbezirke (histologisch: niedrige Eisenkonzentration) im Zentrum (Nekrose) und in der Peripherie (Infiltrationszone) signalintens dar, das zellreiche Tumorgewebe (histologisch: ausgeprägte Eisenoxid-Phagozytose) bildet dazwischen einen deutlichen, breiten, signalarmen Ring. In T1-gewichteten Sequenzen ist der mittlere Ring weniger hypointens und wesentlich schmaler. Bei sehr kleinen Tumoren lassen sich diese ringförmigen Signalveränderungen nicht finden, sie stellen sich homogen in der T1-Wichtung hyperintens und in der T2-Wichtung hyperintens und in der T2-Wichtung hypointens dar. 9L-Tumoren hatten selten eine zentrale Nekrose, auch wenn sie sehr groß waren; dementsprechend fehlte meist der signalintense (T2) Bezirk im Zentrum dieser Tumoren.

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der MION-Aufnahme in den Tumor wurden 3 Tiere kernspintomographisch nach 1, 6, 12, 24, 72 hrs und 5 ds nach i.v. Injektion von 10 mg Fe/kg MION untersucht (Abb. 14).

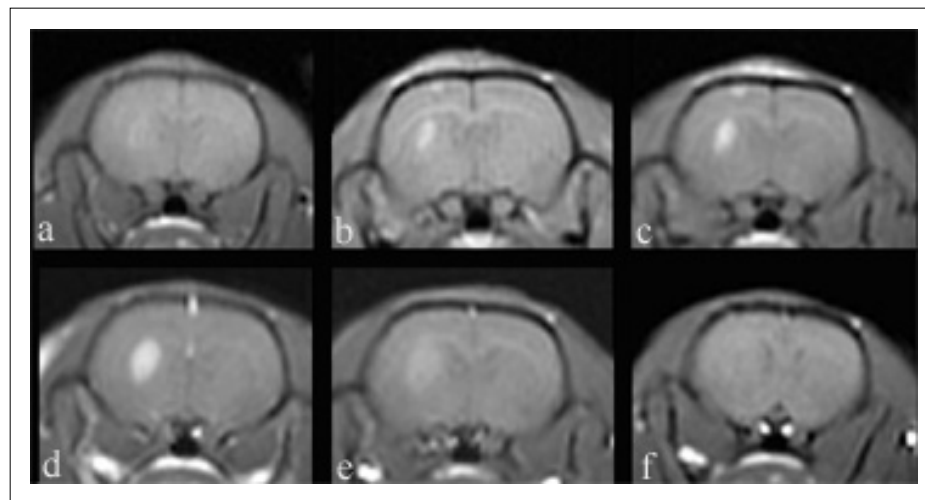


Abb. 14.: MRT im Zeitverlauf

MRT eines C6-Gliom im zeitlichen Verlauf nach MION-Injektion. Präkontrast (a), 1 h (b), 6hrs (c), 1d (d), 3ds (e) und 5ds (f) nach i.v. Injektion von 10 mg Fe/kg MION. Nach 5 Tagen sind keine Signalveränderungen mehr im Tumorgewebe zu erkennen. T1w SE 300/17.

Die Signalveränderungen waren am stärksten zwischen 12 und 24 hrs nach Injektion, nach 3 ds war noch ein schwaches Signal zu erkennen, während dies nach 5 ds vollkommen verschwunden war.

Zur Bestimmung der MION-Schwellendosis, die zur Signalerzeugung notwendig ist, wurden jeweils 2 Tiere mit 2 bzw. 4 mg Fe/kg MION i.v. injiziert. Deutliche Signalveränderungen zeigten sich bei 4 mg Fe/kg MION (Abb. 15),

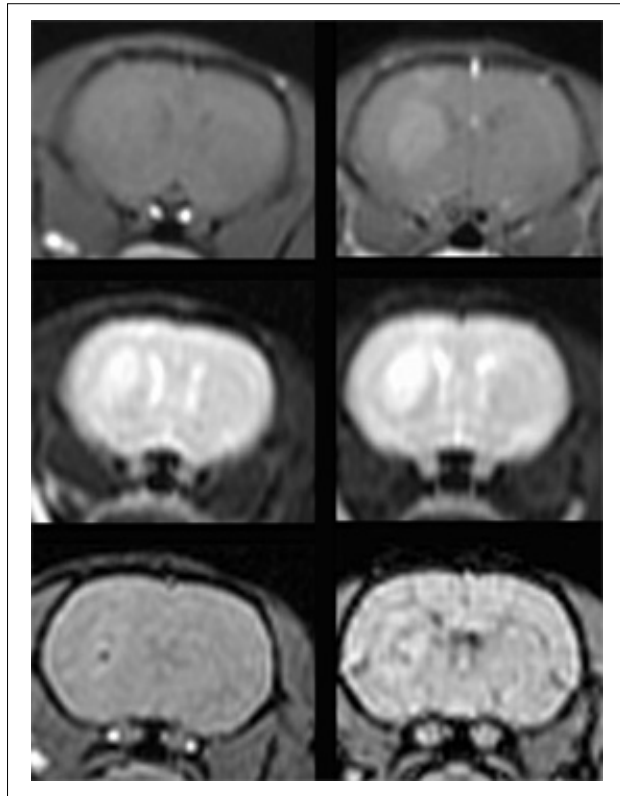


Abb. 15.: MRT des C6-Glioms bei niedrigerer MION-Konzentration

Tumoren Enhancement nach Injektion einer niedrigeren MION-Dosis (4 mg Fe/kg MION). MRT vor (linke Reihe) und 24 Stunden nach Eisenoxidinjektion (rechte Reihe). Das Tumoren Enhancement ist geringer ausgeprägt als in Abb. 13, die ringförmige Konfiguration ist nur angedeutet zu erkennen. T1w SE obere Reihe, T2w SE mittlere Reihe, GRE-Sequenz untere Reihe.

während 2 mg Fe/kg MION (= klinisch z.Zt. zugelassene Dosis für kommerziell erhältliche Eisenoxidpräparation) zu keiner nennenswerten Signaländerung führten (225a).

3. 3. 2. Histologie

Alle Gehirne wurden histologisch insbesondere zur genauen Lokalisation des in vivo injizierten MION im Gewebe untersucht. MION lässt sich mit konventionellen Eisenfärbungen (Perls Blue verstärkt mit DAB) histologisch darstellen.

Die Größe und Form der Tumoren korrelierte eng mit der Histologie und T2-gewichteten post

MION MR-Bildern. C6 ist ein zellreicher Tumor mit meist runden Tumorzellen, 9L zeigt langgezogene spindelförmige Tumorzellen. C6-Tumoren wiesen in der Regel bereits ab einer Größe von 5 mm eine meist zentrale Nekrose auf. Demgegenüber zeigten nur die größeren 9L-Tumoren (größer 7mm) meist diffus verteilte, kleine strichförmige Nekrosen.

Die Eisenfärbungen ergaben bei beiden Tumoren den Nachweis von großen Mengen intrazellulärem Eisen im Tumorgewebe, wobei das Eisen im Zytoplasma der Tumorzellen lokalisiert war (Abb. 16).

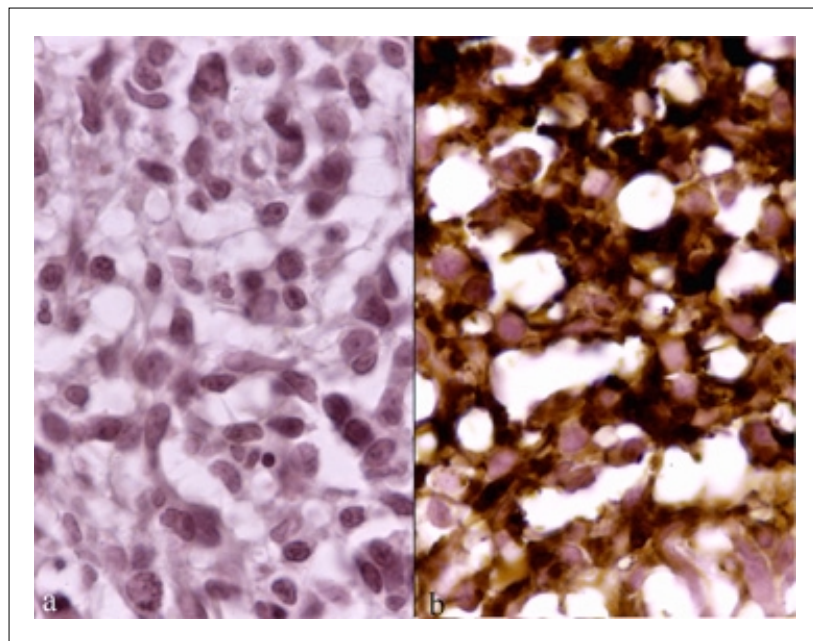


Abb. 16.: Intrazelluläre MION-Aufnahme in das Zytoplasma von C6-Zellen

C6-Tumor mit mikrozystischer Degeneration. HE-Färbung (a). Intrazelluläre Eisenoxidaufnahme in das Zytoplasma der Tumorzellen, das Eisen zeigt sich als braunes Reaktionsprodukt. DAB verstärkte Eisenfärbung (b). Vergrößerung X 400.

Größere Eisenablagerungen zeigten sich als dunkelbraunes Reaktionsprodukt, während niedrigere Konzentrationen das Zytoplasma hellbraun anfärbten. Darüber hinaus ließ sich Eisen auch noch vor allem intrazellulär in Makrophagen und im interstitiellen Raum nachweisen. Die Menge der phagozytierenden Tumorzellen variierte bei gleicher intravenös injizierter MION-Dosis von Tier zu Tier. Während bei einigen Tumoren der ganze Tumor diffus angefärbt war (Abb. 17), hatten bei anderen Tumoren nur vereinzelte Tumorzellen und Makrophagen die Eisenoxide phagozytiert (Abb. 18).

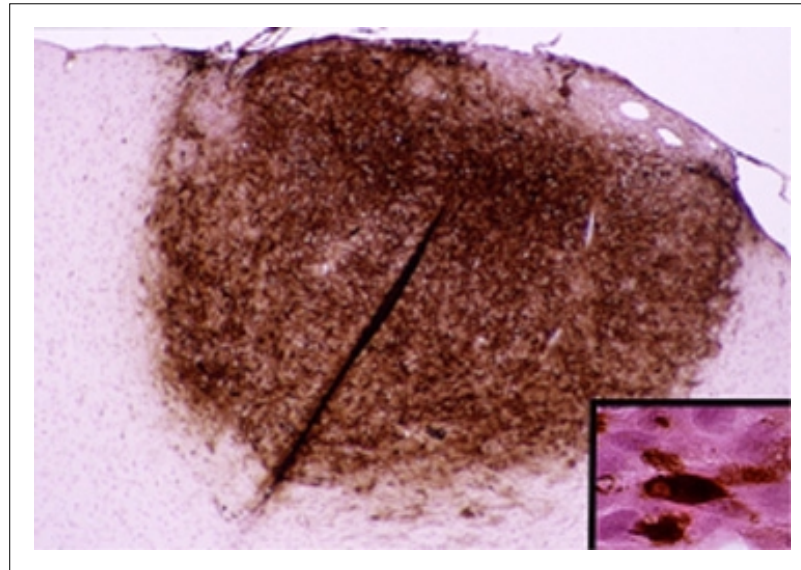


Abb. 17.: Homogene Eisenaufnahme in einem 9L-Tumor

Ausgeprägt homogene Eisenoxidablagerung in einem 9L-Gliom nach i.v. Injektion von 10 mg Fe/kg MION. Intrazelluläre Eisenoxidaufnahme in 9L Gliomzellen (re. unten). DAB verstärkte Eisenfärbung. Vergrößerung X 400 (Ausschnitt).

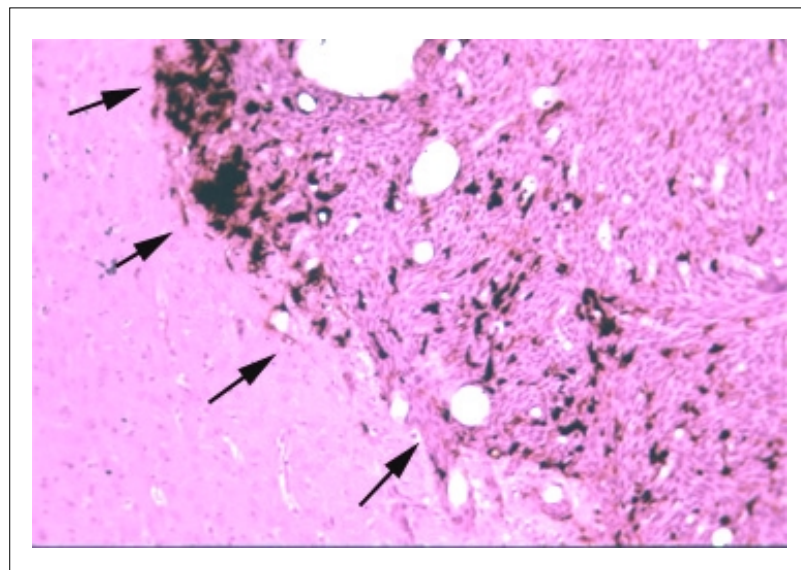


Abb. 18.: Nur partielle Eisenphagozytose durch Tumorzellen und Makrophagen

Nach Injektion von 4 mg Fe/kg MION intrazelluläre Eisenoxidaufnahme durch nur wenige 9L-Zellen und Makrophagen, bevorzugt am Tumorrund. (Pfeile). DAB-verstärkte Eisenfärbung. (Vergrößerung X 100).

Die Menge an abgelagertem Eisen innerhalb der Tumoren korrelierte klar mit der injizierten MION-Dosis. Große Mengen von intrazellulären Eisenoxidablagerungen im Tumorgewebe zeigten sich insbesondere bei den Tieren, denen hohe Dosen von Eisenoxiden (10 und 20 mg Fe/kg MION)

injiziert worden waren. Bei den Tieren, denen nur 2 bzw. 4 mg Fe/kg MION injiziert worden waren, ließ sich histologisch nur in Ausnahmefällen intrazelluläres Eisenoxid nachweisen. Die Korrelation der beschriebenen MR-Ringstrukturen mit der Histologie zeigte zellreiches Tumorgewebe im Bereich des signalarmen Ringes (Tu), die beiden Zonen erhöhter Signale entsprachen Nekrose (N) im Zentrum und infiltrierendem Tumorgewebe (In) in der Peripherie (Abb. 19).

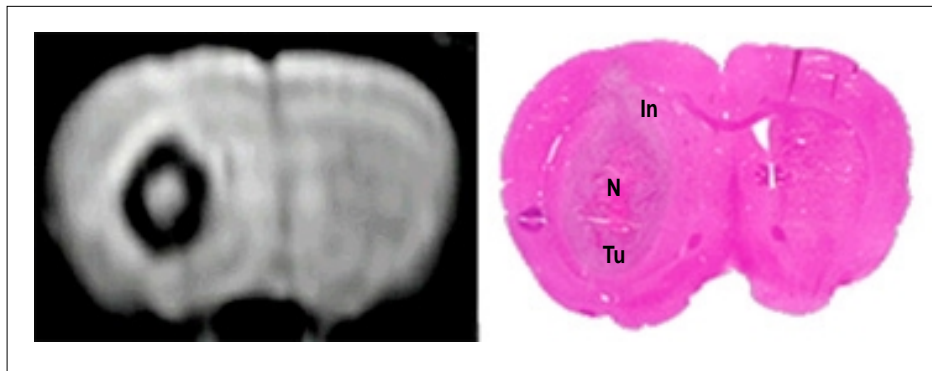


Abb. 19.: Korrelation von Histologie und MRT

Ausgeprägter Signalabfall im Bereich des vitalen Tumorgewebes (Tu) als signalhypointenser Ring. Die hyperintensiven Bezirke entsprechen Arealen mit geringerem Eisenoxidgehalt: Nekrose im Tumorzentrum (N) und Tumorzellinfiltrationszone (In). MRT, T2w SE 1500/40 links; korrespondierender HE-gefärbter histologischer Schnitt rechts.

Die Eisenoxidablagerungen korrelierten mit der Tumervaskularisation, sowohl C6 als auch 9L waren in der Tumorperipherie am stärksten vaskularisiert. Dort zeigten sich auch die höchsten Eisenoxidablagerungen. Besondere Aufmerksamkeit wurde den in das gesunde Hirnparenchym infiltrierenden Tumorzellen gewidmet. Über die Expression von β -Galactosidase waren diese Zellen eindeutig von normalen, nicht neoplastischen Gliazellen zu differenzieren. Obwohl beide experimentellen Gliome (C6, 9L) in der Regel zum umgebenden Hirngewebe metastasenartig scharf demarkiert waren, zeigten sich bei beiden Tumoren immer wieder unscharf abgegrenzte Areale, in denen die Tumorzellen infiltrativ in das gesunde Gewebe migrierten (Abb. 20 und 21).

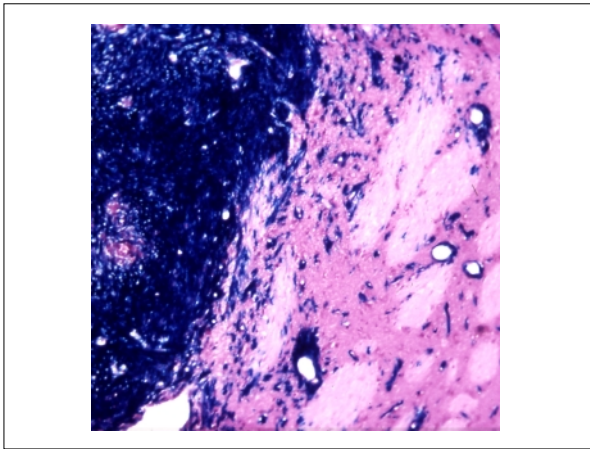


Abb. 20. Infiltrationszone eines C6-Glioms

Der Tumor ist gegenüber dem umliegenden Gehirn unscharf begrenzt, er infiltriert häufig entlang von Gefäßen in das umliegende Hirngewebe. Die Tumorzellen sind in der β -Galaktosidasefärbung blau (transfizierte Zelllinie).

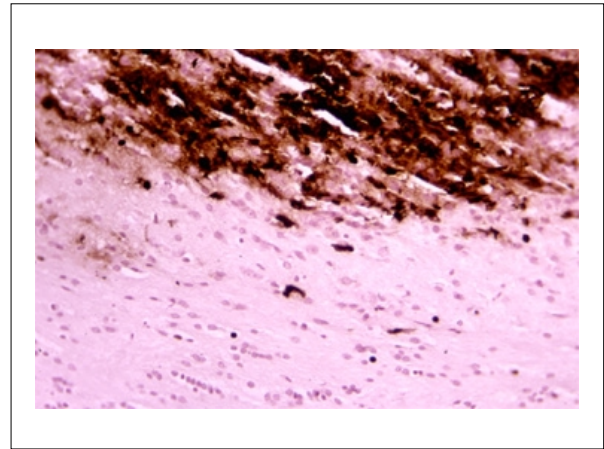


Abb. 21.: Infiltrationszone eines 9L-Glioms

Einzelne infiltrierende Tumorzellen zeigen eine Eisenphagozytose. DAB-verstärkte Eisenfärbung. Vergrößerung X 200

Häufig zeigten auch diese singulären, infiltrierenden Tumorzellverbände eine Eisenphagozytose. Auffallend war, dass diese Zellen meist entlang von Gefäßen in das umliegende Hirngewebe migrierten (Abb. 20).

Das gesunde Hirngewebe war ansonsten komplett Eisen-negativ, abgesehen von einigen Hirnregionen mit bekannt hohem Eisengehalt (Substantia nigra, Nucleus dentatus, Nucleus interpeduncularis) und wenigen Arealen mit physiologisch fehlender Blut-Hirn-Schranke (u.a. Plexus choroideus): Hier ließen sich kleinere Eisenablagerungen finden.

3. 4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Dextran-Eisenoxidverbindung (MION) nach intravenöser Injektion *in vivo* von implantierten Gliomzellen phagozytiert wird. Histologisch findet sich MION dann hauptsächlich im Zytoplasma von Tumorzellen, wenn höhere, über die zur Zeit zugelassenen Dosen hinausreichende Eisenoxidkonzentrationen, appliziert werden. Die Konzentration der phagozytierten Eisenoxidpartikel ist hoch genug, um in der MR-Bildgebung charakteristische Signalveränderungen innerhalb der einzelnen Tumorareale zu verursachen.

Die Interpretation der MR-Bildgebung nach intravenöser Eisenoxidgabe ist komplex und erklärt

sich aus einer Kombination pharmakologischer, magneto-physikalischer und histologischer Phänomene. Charakteristischste Signalveränderung ist die dramatische Signalabnahme in T2-gewichteten Sequenzen in Arealen mit hohem Eisengehalt. Diese Verkürzung der T2-Relaxationszeit mit konsekutiver Signalauslöschung ist charakteristisch für Eisenoxide und seit langem bekannt (184). Kleine Tumoren zeigen die einfachsten Muster der MR Veränderungen mit einer homogenen T2-Signalabnahme und einer entsprechend homogenen T1-Signalsteigerung. Die MR-Darstellung von größeren Tumoren in konzentrischen Ringen stellt ein interessantes Phänomen dar und muss vor dem Hintergrund der im Gewebe abgelagerten Eisenkonzentrationen gesehen werden. Wie bereits erwähnt, bewirken Eisenoxide in T2-gewichteten Sequenzen monophasisch, unabhängig von der Eisenkonzentration, immer eine herabgesetzte Signalintensität. Dagegen ist das Signal in T1-gewichteten Sequenzen biphasisch von der Eisenoxidkonzentration abhängig: Eisenkonzentrationen (kleiner 10 mg Fe/mm^2) führen zu einem Signalanstieg, während große Eisenmengen (größer 10 mg Fe/mm^2) in einem verminderten Signal resultieren (225). In der T1-Wichtung reflektiert somit der mittlere schmale signalarme Ring den zell- und gefäßreichen vitalen Tumorabschnitt mit hoher Eisenphagozytose. Der T1 signalintense innere und äußere Ring repräsentiert Zonen mit geringerer MION-Konzentration. Im Tumorzentrum wird diese durch verminderte Tumervaskularisation, Zellularität und metabolische Aktivität verursacht. Der äußere Ring mit niedriger Eisenablagerung repräsentiert Eisen-phagozytierende Tumorzellen und Makrophagen, welche infiltrieren und sich mit noch normalem Hirngewebe mischen. Der T2-signalintense Ring im Zentrum (Zyste/Nekrose) und in der Peripherie reflektiert den erhöhten Flüssigkeitsgehalt dieser Regionen und weniger den Eisengehalt (225a).

Die Experimente zum Zeitverlauf der MR-Signalveränderungen nach intravenöser MION-Gabe spiegeln die bekannten pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Verbindung wider (210). Die in dieser Untersuchung angewandte Eisenoxidverbindung hat eine Bluthalbwertszeit von 4,5 hrs. Die stärksten Signalveränderungen im Tumor ließen sich zwischen 12 und 24 hrs nach intravenöser Injektion finden, waren nach 3 ds noch deutlich sichtbar und nach 5 ds fast vollkommen verschwunden. Dieser Zeitverlauf ist zu vereinbaren mit der Eisenoxidablagerung zunächst im Gewebeinterstitium, der Phagozytose durch metabolisch hoch aktive Tumorzellen und dem intrazellulären Abbau innerhalb von Lysosomen mit folgender Einschleusung des Eisens in den körper-

eigenen Eisenpool.

Dass Gliomzellen Phagozytosekapazitäten besitzen, ist sowohl aus Zellkulturexperimenten (226, 227) als auch aus histologischen Untersuchungen menschlicher Tumoren bekannt. Immunhistochemisch können Hirntumore Phagozytosemarker exprimieren, was zum Teil zum histologischen Grading und zur Klassifikation der Tumoren benutzt wird (1). Tumorzellphagozytose ist im Rahmen der Tumordinvasion von Bedeutung: Das umgebende Gewebe wird u.a. durch Enzyme der ortsständigen Tumorzelle phagozytiert. Gegenüber normaler, ebenfalls zur Phagozytose fähiger astrozytärer Glia ist die Phagozytosepotenz neoplastischer Glia wesentlich stärker (227). Darüber, dass Gliomzellen auch primär i. v. injizierte Eisenoxidpartikel phagozytieren, besteht nach den vorliegenden Untersuchungen kein Zweifel. Allerdings sind dazu bei den angewandten Verbindungen sehr hohe lokale Eisenoxidkonzentrationen in der Tumorzellumgebung notwendig.

Verglichen mit den Gliomzellen selbst werden solche Eisenoxidpartikel jedoch quantitativ in wesentlich höherem Maße von Blutmakrophagen und von ortsständigen, aktivierten Mikrogliazellen intrazellulär aufgenommen. Es ist seit langem bekannt, dass Gliome fast immer (zwischen 85%-100%) von lymphatischen Zellen und Makrophagen infiltriert sind (228). Der Anteil der Makrophagen an Gesamtstumormasse und -volumen ist beträchtlich und wurde in frühen Studien anhand von Zellsuspensionen mit 41% ermittelt (229). Neuere histologische Studien ergaben einen Anteil der Makrophagen zwischen 10-30%, mit maximalen Werten von zum Teil über 50% (230). Die Lokalisation der Makrophagen ist nicht, wie vielleicht erwartet, auf nekrotische Areale des Tumors beschränkt, sondern weist neben einer unspezifischen Infiltration in das Tumorparenchym eine spezifische Verteilung am Tumorrand auf (231). Makrophagen bilden einen gürtelförmigen Saum an der Peripherie des Tumors und grenzen ihn so scheinbar gegen das Hirngewebe ab (232).

Kürzliche Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass auch im experimentellen Modell sowohl C6-Gliome als auch 9L-Gliome in hohem Maße von diesen beiden Zelltypen infiltriert sind (233). Auch hier zeigten sich unterschiedliche Verteilungsmuster: z. T. waren die Makrophagen innerhalb des Tumors mehr diffus verteilt, manchmal bildeten sie eher nur einen Randsaum an der Tumorpheripherie (Abb. 22).

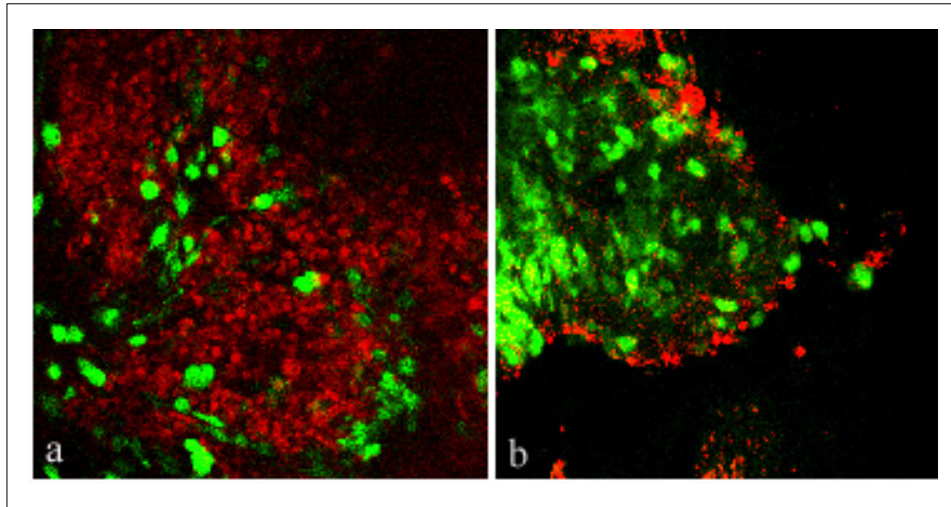


Abb. 22.: Makrophagenmarkierung in experimentellen Gliomen

GFP-transfizierter F98-Tumor (grün) nach Inkubation mit Texas Red-markiertem Eisenoxid (rot). Hoher Anteil an Eisen-beladenen Makrophagen innerhalb des Tumors (a). Ein anderer Tumor zeigt einen Makrophagensaum mehr an der Tumorpheripherie (Pfeil)(b).

Dabei kann selbst histologisch nicht sicher zwischen Blutmakrophagen und aktivierter Mikroglia unterschieden werden.

Sowohl in vitro Untersuchungen als auch in vivo Untersuchungen zeigten eine hohe Aufnahme von Eisenoxiden in primär nicht ortsständigen Makrophagen, es ließ sich aber auch eine quantitativ ähnliche Aufnahme in Mikroglia feststellen (Abb. 23).

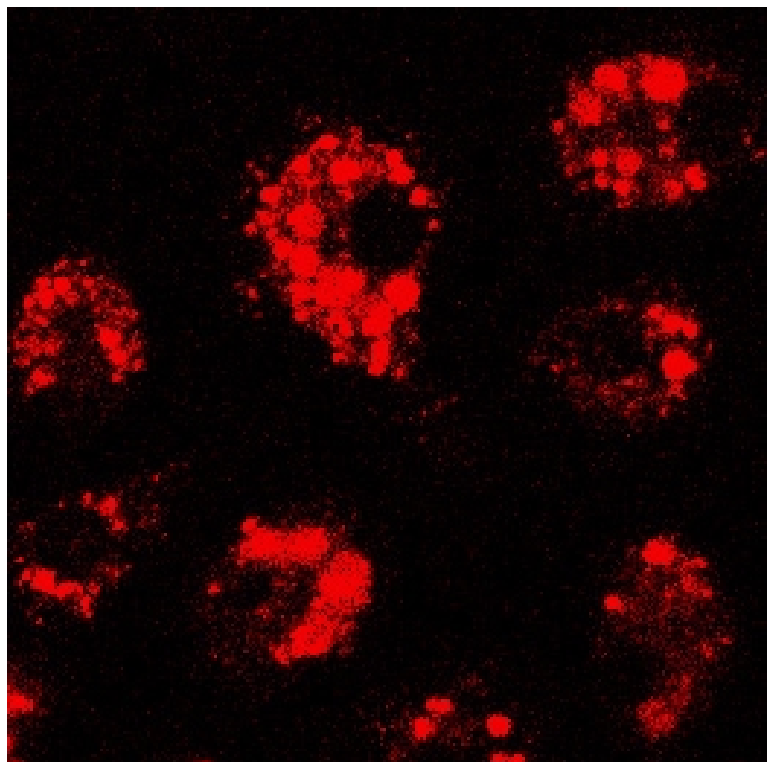


Abb. 23.: Kultivierte Mikroglia nach Inkubation mit Eisenoxidpartikeln

Ausgeprägte Aufnahme von fluoreszenzmarkierten (Texas Red) Eisenoxidpartikeln (rot) in das Zytoplasma der Zelle.

Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich von Moore und Mitarbeitern publiziert, die den Anteil der Zellen mit intrazellulärer Eisenoxid-Aufnahme in Gliomzellen an der Gesamttumormasse bei 49%, in Makrophagen bei 21% und in Endothelzellen bei 6,5% ermittelten (234). Allerdings wurde in dieser Untersuchung nicht gesondert auf die Rolle der Mikroglia eingegangen, die nach unseren Ergebnissen nicht unwesentlich sein dürfte.

Mikroglia stellt eine Besonderheit des Gehirns bezüglich der immunologischen Situation und Reaktion auf pathologische Prozesse im Vergleich zu anderen Regionen des Körpers dar. Mikrogliazellen als immunkompetente Zellen des ZNS werden, wie sich auch experimentell zeigen ließ, von Gliomen aktiviert (235). Durch die dabei wechselseitig ausgelösten immunmodulatorischen Prozesse spielt die Präsenz aktivierter Mikroglia im Hirnparenchym die Rolle eines frühzeitigen, empfindlichen Sensors für pathologische Vorgänge innerhalb des Gehirns (236). Die Aktivierung von Mikroglia führt über mehrere Stufen zu einer Transformation der Zellen in einen phagozytotisch aktiven Zustand, der dem eingewanderter Makrophagen entspricht. Diese Transformation konnte ohne Störung der Blut-Hirn-Schranke am Fazialis-Läsions-Modell beobachtet werden, wobei das Einwandern von Blutmakrophagen ausgeschlossen ist (237). Untersuchungen von Morioka et al. wiesen darauf hin, dass es sich hierbei überwiegend um aktivierte Mikrogliazellen handelt, welche als direkte Abwehrreaktion des ZNS eine Barriere um Gliome bilden (232). Bis heute ist allerdings die genaue Funktion der Mikroglia im Rahmen der Pathogenese von Gliomen nicht endgültig geklärt, auch eine unterstützende Rolle bei der Ausbreitung des Tumors erscheint nach neueren Untersuchungen als nicht ausgeschlossen (238) (239) (240).

Ob und in welchem Maße Eisenoxidpartikel in das Tumorgewebe transportiert werden, ist im wesentlichen an die Tumervaskularisation gekoppelt. Dementsprechend kommt es nach intravenöser Eisenoxidgabe in den Tumorarealen mit starker Neovaskularisation zu der größten Eisenphagozytose. Da die untersuchten experimentellen Hirntumore hauptsächlich von der Tumorpheripherie versorgt wurden, ließen sich hier auch die größten MION-Ablagerungen finden. Ob das KM die Gefäße verlässt und in das Tumorinterstitium gelangt, ist, wie schon angesprochen, abhängig von der Beschaffenheit der BHS/BHTS. Bei Gliomen ist diese heterogen, ferner ändert sich die Intaktheit mit dem Grad der Entdifferenzierung: Es gilt die Regel, dass die Gefäßpermeabilität

um so stärker erhöht ist, je maligner der Tumor ist. Diese Abhängigkeit von dem Zustand der BHS/BHTS kann bei der Charakterisierung von Tumoren durch Kontrastmittel ein Problem darstellen, da insbesondere Tumoreale mit noch intakter Bluttumorschranke durch KM nicht erreicht werden. Zur Lösung dieses Problems bieten sich Maßnahmen an, die intakte BHS durch artifizielle Öffnung oder durch BHS-gängige Pharmaka auch für KM passierbar zu machen (s. Kapitel 2, 6 und 7).

Selbstverständlich spielt bei der Ablagerung der KM zunächst im Gewebeinterstitium und dann bei der intrazellulären Aufnahme auch die Größe des KM eine wesentliche Rolle. Pulfer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass magnetische Partikel mit einer der hier angewandten Präparation vergleichbaren Größe von 20 nm in einem signifikant höherem Maße in Tumorzellen aufgenommen werden als größere (1 μ m) Partikel (241). Größere Partikel scheinen selbst eine gestörte BHS nicht zu passieren. Auch die Partikel-Ladung scheint eine Rolle zu spielen, wobei tendenziell negativ geladene Partikel eine stärkere interstitielle Ablagerung zeigen als ungeladene Partikel (241).

Eisenoxide unterscheiden sich bei der MR-Tumordarstellung wesentlich von den bisher klinisch angewandten gängigen Kontrastmitteln. Über den biphasischen Signalverlauf in T1-gewichteten Sequenzen kann auf Grund der Signalintensität (hypo-oder hyperintens) auf die Menge des abgelagerten oder phagozytierten Kontrastmittels geschlossen und damit akkurater zwischen verschiedenen Tumorealen unterschieden werden. Die im Vergleich zu anderen Kontrastmitteln deutlich längere Zirkulationszeit im Blut (MION bei der Ratte 4,5 hrs, Gd-DTPA < 0,5hrs) als auch die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindungen führen zur höheren Kontrastmittelakkumulation zunächst im Zellinterstitium und später in den phagozytierenden Zellen des Gehirns. Zugleich ist die Nachweisbarkeit im Gewebe bei Eisenoxidpartikeln signifikant höher. Frühere Untersuchungen zeigten, dass mit den extrem Eisen-empfindlichen GE-Sequenzen bereits eine Konzentration von 62 ng Fe/mm³ genügt, um im MR-Bild eine eindeutige Signaländerung hervorzurufen (225). Während mit Gd-DTPA seine Ablagerung im Gewebeinterstitium und damit indirekt die Blut-Hirn-Schranke visualisiert wird, sind die Signaländerungen nach MION-Injektion eher zellbezogen, da Eisenoxide intrazellulär von den Tumorzellen und Makrophagen aufgenommen werden. Diese Möglichkeit der direkten Darstellung der Tumorzelle selbst sollte

theoretisch Vorteile, insbesondere in der deutlicheren Abgrenzung des Tumorrandes, bringen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die intravenöse Eisenoxidgabe zu spezifischen MR-Signalveränderungen bei Hirntumoren führt, die sich von herkömmlichen Kontrastmitteln unterscheiden. Die Signalveränderungen lassen sich mit den physiochemischen und magnetischen Eigenschaften dieser Verbindungen erklären und erlauben eine Differenzierung unterschiedlicher Tumorareale. Die MR-Bildgebung nach Eisenoxidgabe stellt eine potentielle Möglichkeit dar, funktionelle (Phagozytose durch Makrophagen und Tumorzellen) und patho-anatomische Veränderungen (z. B. Tumorrand) bei hoher Gewebeauflösung darzustellen.

4. In vitro Untersuchungen zur Eisenoxidaufnahme

4. 1. Fragestellung

Es sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene Zelllinien (zwei Gliom-Zelllinien, eine Karzinom-Zelllinie) Eisenoxidpartikel auch in vitro intrazellulär aufnehmen, ob es quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Phagozytosepotenz gibt und was der Schwellenwert der benötigten Eisenoxiddosis für die intrazelluläre Aufnahme ist. Über fluoreszenzmarkierte Eisenoxidpartikel sollte der intrazelluläre Transport und Abbaumechanismus untersucht werden.

4. 2. Material und Methoden

4. 2. 1. Zelllinien

In vitro wurden 3 verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Dignität und Malignität hinsichtlich ihrer Aufnahme von Eisenoxidpartikeln untersucht: Neben den beiden bereits vorbeschriebenen Gliom-Zelllinien C6 und 9L (s. Kapitel 3.2.1.) wurde zusätzlich die Karzinom-Zelllinie LX-1 in vitro untersucht. Während 9L und C6 beide primär chemisch induziert wurden ist LX-1 ist eine menschliche Zelllinie eines Lungenkarzinoms (Mason Research Institute, Worcester, MA). C6 und L9 wurden in DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium, Gibco BRL, Kat.-Nr. 31966-021) zusammen mit 10% FKS (fötales Kälberserum, Gibco BRL, Kat.-Nr. 10106-060) kultiviert, LX-1 in RPMI 1640 Medium, welches ebenso mit 10% FKS versetzt worden war.

4. 2. 2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Markierung der Eisenoxide für die Fluoreszenzmikroskopie wurden gleiche Mengen MION (0,675 ml von 40,0 mg Fe/ml) mit einem bis zu 20fach molaren Überschuss von Rhodamin-Isothiocyanat (Molecular Probes, Eugene, OR), welches in Dimethylsulfoxid (4,5 mg/ml) aufgelöst war, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 hrs wurde das ungebundene Rhodamin von der Eisenoxidpräparation säulenchromatographisch (Sephadex G25, Pharmacia, Uppsala, Schweden) getrennt und die Fluoreszenzbindung mikroskopisch untersucht. Gemäß spektrophotometrischen Untersuchungen bei 576 nm waren pro MION-Partikel ungefähr 40-60 Moleküle Rhodamin gebunden.

Ein Tag vor der mikroskopischen Auswertung wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der drei Linien (C6, 9L, LX-1) auf ein UV-sterilisiertes, 25 mm im Durchmesser messendes Deckglas pipettiert, welches den Boden einer Kulturplatte (6-Loch) bedeckte. Jede Einheit enthielt 1,5 ml DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum. In dieser Verdünnung ließen sich am Untersuchungszeitpunkt bei 10facher Vergrößerung zwischen 5 und 50 Zellen zählen. Unmittelbar vor dem Experiment wurde überschüssiges Medium entnommen, anschließend wurden die Zellen für 15 bis 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Rhodamin-MION in Serum-freien DMEM inkubiert. Das Medium wurde dann beseitigt und die Zellen gespült. Die mit den Zellen bedeckten Deckgläser wurden in eine Kammer montiert, die es erlaubt, Zellen und Medium unter konstanter Temperatur bei 37°C für einen längeren Zeitraum in vivo zu mikroskopieren (242). Diese Kammer wurde an ein Inversionsmikroskop (Zeiss Axiovert 00 TV, Wetzlar, Germany) angepasst, wobei für die Fluoreszenzmikroskopie ein Rhodamin-Filter-Set (XF 32, Omega Optical, Brattleboro, VT) benutzt wurde. Zur Dokumentation wurden die Zellen nach Inkubation mit MION in vivo fotografiert (Zeiss MC 80, Wetzlar, Germany).

4. 2. 3. Quantifizierung der Kontrastmittelphagozytose

Zur Quantifizierung der zellulären Eisenaufnahme in vitro wurde MION mit ^{125}I markiert. Dazu wurde gereinigtes MION mit ^{125}I (574 mCi/mmol Fe; Amersham, Arlington Heights, IL) in Gegenwart von Iodo-Gen Iodierungsreagenz (Pierce, Rockland, IL) inkubiert, um ca. 70mCi/mmol Fe zu erhalten. Die Phagozytose von MION wurde quantitativ in vitro zwischen den Zelllinien 9L und LX-1 verglichen. Dazu wurden Zellen in Kulturplatten (6-Loch) pipettiert und abgewartet, bis sie zu 60% konfluieren. Das Medium wurde entfernt und MION- ^{125}I in verschiedenen Konzentrationen (2-100 $\mu\text{g/mol Fe}$) in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum hinzugegeben (1,5 ml/Loch). Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Lösungsüberschuss abgegossen und die Zellen dreimal in Hank's Lösung gewaschen. Anschließend wurde in jede Einheit Triton-X hinzugefügt und der Protein-Gehalt mit einem BCA Protein-Essay (Pierce Chemical C, Rockford, Ill, USA) bestimmt. Nach Erstellung einer Kalibrierungskurve für den Proteingehalt wurde jede Konzentrationseinheit ausgewertet. Die quantitativen Bestimmungen wurden jeweils einmal wiederholt.

4. 3. Ergebnisse

Bei Inkubation mit MION-Rhodamin ließ sich bei allen drei Zelllinien in großen Mengen fluoreszierendes MION intrazellulär finden, wobei sich die Lokalisation im Zeitverlauf veränderte. Zunächst war MION in tubulären Strukturen lokalisiert, die ca. 1 μm im Durchmesser und 5-25 μm in der Länge maßen (Abb. 24). Morphologisch handelt es sich dabei am ehesten um tubuläre Lysosomen.

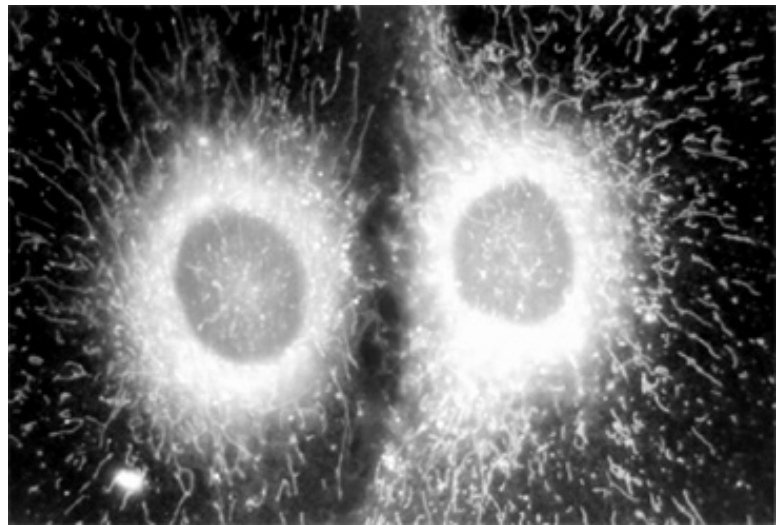


Abb. 24.: Fluoreszenzmikroskopie von MION-Rhodamin markierten C6-Zellen
3 Stunden nach Inkubationsbeginn. MION-Rhodamin ist in tubulären Strukturen („tubuläre Lysosomen“) intrazellulär lokalisiert.

24-48 hrs nach Inkubationsbeginn verlagerte sich die Lokalisation, der Hauptanteil findet sich dann hauptsächlich in ca. 1-2 μm messenden, Membran-begrenzten, perinukleären Vesikeln (Abb. 25).



Abb. 25.: Fluoreszenzmikroskopie von MION-Rhodamin markierten C6-Zellen
48 Stunden nach Inkubationsbeginn. MION-Rhodamin ist in kleinen vesikulären Strukturen lokalisiert („terminale Lysosomen“).

Diese Strukturen entsprechen morphologisch vesikulären Endosomen („terminale Lysosomen“) und waren bis zu 14 ds nach Inkubationsbeginn zu verfolgen. Bezüglich der Morphologie des beschriebenen Anreicherungsverhaltens gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zelllinien.

Quantitativ nahmen die untersuchten Zelllinien in vitro in unterschiedlichem Maße MION auf. Die Aufnahme von MION in vitro zeigt Tab. 1.

Zelllinie	ng Fe/10⁶ Zellen	MION-Partikel/Zelle
Gliom (C6)	10	50
Gliosarkom (9L)	17	85
Karzinom (LX1)	1580	7 900

Tab. 1.: Quantitativer Vergleich bezüglich der intrazellulären MION-Aufnahme von drei verschiedenen Zelllinien
Signifikant höhere Eisenoxidaufnahme durch die Karzinom-Zelllinie verglichen mit den Gliom-Zelllinien.

Bei den höchsten Inkubationskonzentrationen betrug die zelluläre Aufnahme bei der C6-Linie 10 ng MION/10⁶ Zellen, bei der 9L-Linie 17 ng MION/10⁶ Zellen, während sie bei der Karzinom-Zelllinie deutlich höher war (158 ng MION/10⁶ Zellen)(243).

4. 4. Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen ließ sich zeigen, dass die angewandten Eisenoxidpartikel auch in vitro von C6- und 9L-Gliom-Zellen in Konzentrationen bis zu 10 bzw. 17 ng MION/10⁶ Zellen intrazellulär aufgenommen werden. Hochgerechnet bedeutet dies ungefähr 50 bzw. 85 Partikel pro Zelle. Die Tatsache, dass Eisenoxidpartikel auch von Tumorzellen intrazellulär aufgenommen werden, steht im Gegensatz zu der jahrelang aufrechterhaltenen Hypothese, dass ausschließlich Zellen des RES diese Partikel aufnehmen. Insgesamt allerdings ist die Menge von aufgenommenen Eisenpartikeln bei Tumorzellen relativ gering. Moore und Mitarbeiter konnten zeigen, dass primäre, aus dem Blut stammende Makrophagen um mehr als das zehnfache an Eisenoxidpartikel intrazellulär aufnehmen (205), was sich mittlerweile auch durch eigene Untersu-

chungen bestätigen ließ (233). In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Mikrogliazellen als ortsständige Makrophagen des Gehirns eine quantitativ vergleichbar hohe Phagozytose dieser Eisenoxidpartikel aufweisen.

Der genaue Mechanismus, der zur Aufnahme von KM und von Eisenoxiden im speziellen in Tumorzellen führt, ist bislang nur unzureichend untersucht. Die Aufnahme von Partikeln in die Tumorzellen wird neben der Größe und der Ladung der Partikel ganz offensichtlich auch von den Oberflächeneigenschaften dieser Verbindungen beeinflusst. Es konnte in vivo gezeigt werden, dass die Dextranhülle der Eisenpartikel, wenn sie intravenös gegeben werden, Plasmaproteine bindet, was als „Opsonisation“ bezeichnet wird (244, 245). Opsonierte Partikel werden in einer 6-fach höheren Menge intrazellulär aufgenommen, verglichen mit nicht an Proteine gebundenen Eisenoxiden (205). Als Aufnahmemechanismus kommt sowohl ein Rezeptor vermittelter Transport als auch einfache Pinozytose in Frage. In dem Zusammenhang kann von Bedeutung sein, dass die Aufnahme in die Tumorzellen von Rhodamin-MION bereits in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich von kleiner 10 μM erfolgte, was deutlich unter der für einen pinozytotisch vermitteltem Konzentrationsspanne liegt. Dies deutet darauf hin, dass weniger Pinozytose als ein Rezeptor vermittelter endozytotischer Aufnahmemechanismus („Tumorzellendozytose“) für den Transport von MION in die Tumorzelle eine Rolle spielt. Ebenfalls in diese Richtung weisen Koinkubationsversuche: Koinkubationen von Gliom-Zelllinien mit MION-Albumin-Rhodamin zusammen mit ungebundenem Albumin oder Dextran ergaben, dass die MION-Aufnahme in die Zellen zwar durch im Überschuss vorhandenes Albumin, nicht aber durch ungebundenes Dextran (als Bestandteil der MION-Hüllsubstanz) gehemmt werden kann (219). Inwieweit die Dextranhülle der Eisenoxidmagnetite bei der intrazellulären Eisenoxid-Aufnahme eine Rolle spielt, ist bislang nicht vollständig untersucht. Dass Dextrane „neurotrope“ Eigenschaften haben, ist seit langem bekannt sind (246).

Einmal intrazellulär aufgenommen findet man die Partikel zunächst in tubulären, später in vesikulären Strukturen. Immunhistochemische Untersuchungen mit lysosomalen Markern zeigten, dass es sich bei diesen aufnehmenden Strukturen um tubuläre Lysosomen handelt bevor die Eisenoxidpartikel über terminale Lysosomen weiter abgebaut werden (Abb. 26).

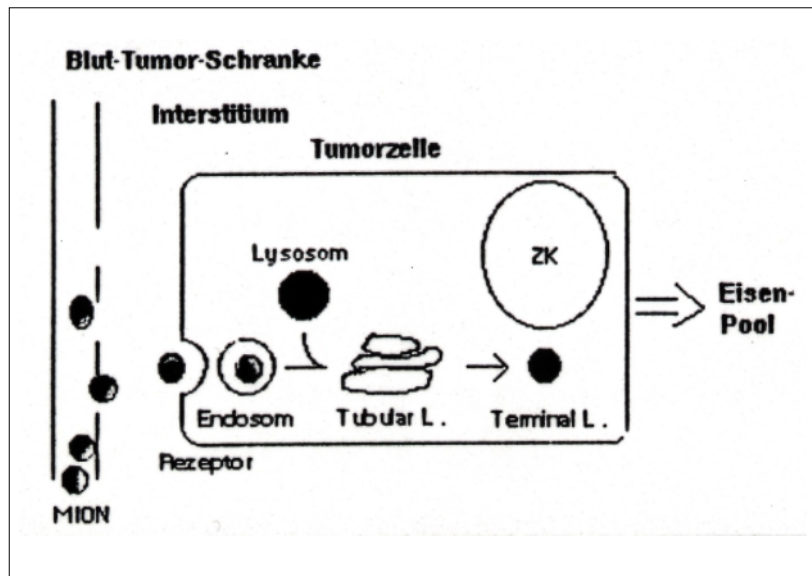


Abb. 26.: Aufnahme und intrazellulärer Abbaumechanismus von Eisenoxiden

Nach Passage der BHS/BHTS, intrazelluläre Eisenoxidaufnahme, Abbau über das lysosomale Kompartiment („tubuläre“ und „terminale“ Lysosomen) und Einschleusung des Eisens in den körpereigenen Eisenpool.

Ein vergleichbarer lysosomaler Abbau wurde für bestimmte Glykoproteine und Antikörper-gekoppelte Agenzien aus der Nuklearmedizin beschrieben (247) (248). Nach ihrem intrazellulären Abbau werden die Eisenoxide dann über einen Zeitraum von 2-40 ds in den Blut-Pool und letztendlich in Hämoglobin überführt (249).

5. MR-Mikroskopie von experimentellen Gliomen

5. 1. Fragestellung

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Eisenoxide intrazellulär *in vivo* von Gliomzellen und Makrophagen des Gehirns aufgenommen werden, sollte untersucht werden, ob diese direkte zelluläre Markierung kernspintomographisch eine bessere Demarkierung dieser Tumoren zur Tumorumgebung ermöglicht. Methodisch sollte dieser Fragestellung mit hochaufgelöster MRT auf nahezu mikroskopischem Niveau (isotrope Voxel-Größe 86 µm) nachgegangen werden.

5. 2. Material und Methoden

5. 2. 1. Modell

Die Gliosarkom-Zelllinie 9L wurde, wie im Kapitel 2. 2. 1. beschrieben, intrazerebral in F 344-Ratten implantiert. Insgesamt wurden 22 Tiere implantiert, 7 davon wurden für MRT-Histologie-Korrelationen benutzt, 15 nur für histologische Zwecke. Die 9L-Zelllinie war mit dem VIK-Retrovirus Vektor transfiziert, dieses trägt das Herpes simplex Typ I TK-Gen unter dem 5' MoMLV LTR-Promotor und das Neomycin-Gen unter einem internen RSV-Promotor (250). (Die transfizierte Zelllinie wurde von X. O. Breakfield, Molecular Neurogenetics Unit, Neuroscience Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School Boston; USA zur Verfügung gestellt). Bei der 9L-Zelllinie ist bekannt, dass sie - verglichen mit der C6-Zelllinie - stärker infiltrativ in das gesunde Gehirn wächst.

5. 2. 2. MR-Technik

In Zusammenarbeit mit G. A. Johnson (Center for *in Vivo* Microscopy, Duke University, NC, USA) wurden von den Tieren sowohl *in vivo* MR-Untersuchungen (1,5 T) als auch *ex vivo* MR-Mikroskopie (9,4 T) Untersuchungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der MR-Untersuchungen hatten die Tumoren einen Durchmesser von 3 bis 4 mm. 24 hrs vor der MR *in vivo*-Bildgebung waren die tumortragenden Tiere mit 10 mg Fe/kg MION intravenös injiziert worden. *In vivo* wurde dasselbe Protokoll gewählt wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben. Zusammengefasst wurden koronare Protonen- und T2-gewichtete SE-Sequenzen (TR 1500msec, TE 40/80 msec, 256x128 Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schnittdicke), T1-gewichtete SE-Sequenzen (TR 300 msec, TE 17 msec, 256x192

Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schnittdicke), und 3 D GRASS Sequenzen (TR 60 msec, TE 20 msec, Flipwinkel 60°, 256x192 Matrix, 8cm FOW, 0,7 cm Schnittdicke) angewandt.

Nach den *in vivo* Untersuchungen wurden die Ratten mit einer Überdosis Phenobarbital getötet und anschließend mit 250 ml NaCl und anschließend mit 250 ml Phosphat gepuffertem, 10%igen Formalin perfundiert. Zur Vorbereitung der *ex vivo* Untersuchungen wurden die Gehirne entnommen und in 10%igen Formalin für 2 ds fixiert. Anschließend wurden die Gehirne in 3 % Agarose-Gel in 20 ml Plastikspritzen eingebettet. Diese wurden zur Fixierung der Gehirne im Magneten benutzt, um Suszeptibilitätsartefakte zu reduzieren und das Gewebe vor Austrocknung zu bewahren. Die MR-mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem 9,4 T (400-MHZ) Magneten (Bruker Instruments, Billerica, MA, USA) mit einer 2,5 cm Spule (hergestellt im Center for *in Vivo* Microscopy, Duke University) durchgeführt. Das Gel wurde erzeugt, indem Agarose-Puder (Gibco) in erhitztem destillierten Wasser aufgelöst worden war. Es wurden axiale GRASS- (TR 100 ms, TE 8 ms, Alpha SA 20) und FSE- (TR 1000 ms, TE 25 ms, Alpha 90) Sequenzen angewendet. Die Matrix betrug 512 x 256 x 256 (frequency x phase x slice), FOVZ 44 mm (frequency), FOVY 22 mm (phase) und FOVX 22 mm (slice), 2 NEX. Damit konnte eine isotrope Voxel-Auflösung von 86 µm erzielt werden. Auf Grund der deutlich dünneren Schnittdicke, bedingt durch die höhere Feldstärke (höhere S/N), kann eine hohe Z-Auflösung erreicht werden. Die Aufnahmen wurden auf einer Silicon-Graphics-Workstation weiterverarbeitet.

5. 2. 3. Histologie

Nach der *ex vivo* MR-Bildgebung wurden die Gehirne koronar mit einem Vibratom (Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) in Serie geschnitten, indem histologisch dieselbe Schnittdicke wie die MR-Schnitte erzielt wurden. Alternierend wurden die Schnitte dann für Eisen und Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Eisenfärbungen wurden mit DAB (entsprechend dem unter 2.2.3 beschriebenen Protokoll) verstärkt.

Einige Gehirne (n = 17) wurden in 6 bis 20 µm dicke Kryoschnitte zur Auswertung der morphologischen Details verarbeitet. Eine Thymidin Kinase (TK)-Färbung wurde durchgeführt, indem die Schnitte zunächst mit 10%igem normalen Ziegenserum in PBS 10 min inkubiert wurden und dann über Nacht bei Raumtemperatur mit dem primären polyklonalen Kaninchen-TK-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 in PBS inkubiert wurden. Nachdem die Schnitte mit Biotin-gebunde-

nem Ziegen-anti-Kaninchen-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert wurden, wurde anschließend die Reaktion mit einem Avidin-Biotin-Peroxydase-Komplex (ABC Kit, Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) durchgeführt. Die Peroxydaseaktivität wurde sichtbar gemacht, indem die Schnitte mit DAB (Sigma Chemicals) für 45 bis 60 sec inkubiert und dann mit Meyers Hämatoxilin gegengefärbt wurden.

5. 2. 4. Datenanalyse/Morphometrie

Für die MR-Histologie-Korrelationen wurden die histologisch gefärbten Vibratom-Schnitte digitalisiert, um sie direkt mit den MR-Daten, welche bereits in einem digitalen Format (NIH Image, Bethesda, MD, USA) zur Verfügung standen, zu korrelieren.

Alle Bildanalysen wurden am Macintosh-Computer oder einer Silicon-Graphics-Workstation durchgeführt. Die Tumorregion eines jeden MR- oder Histologieschnittes wurde festgelegt, indem der äußere Tumorrand per Hand eingezeichnet wurde. Die Korrektheit dieser Tumorrandbestimmung wurde mit dem mikroskopischen, HE oder immunhistochemisch TK gefärbten digitalisierten Bild abgeglichen. Die Tumorregion wurde morphometrisch quantifiziert und als prozentualer Anteil gemessen an der gesamten Hirnoberfläche - ausgedrückt, um den direkten Vergleich zwischen den MRT und histologischen Schnitten zu bekommen.

5. 3. Ergebnisse

5. 3. 1 MR-Morphologie

Auf den T2-gewichteten Aufnahmen ließ sich der Tumor scharf vom umgebenden Hirnparenchym abgrenzen. Abbildung (Abb. 27) zeigt aneinander angrenzende 86 µm dicke MR-Schnitte eines Gehirns 24 hrs nach Kontrastmittelapplikation.

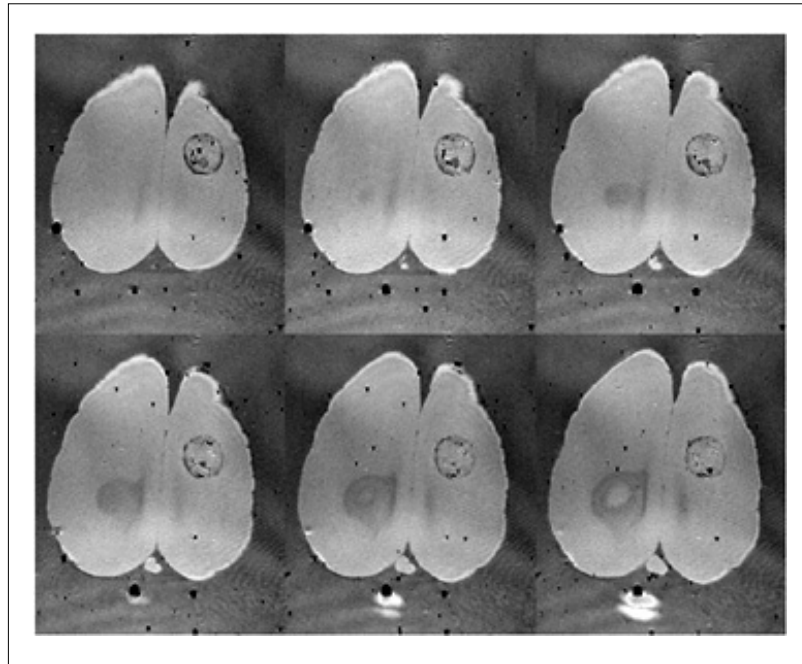


Abb. 27.: MR-Mikroskopie des 9L-Glioms

Hochauflöste MR-Aufnahmen (86 μm ; axiale Schichten durch das Rattenhirn; ex vivo). Eisenoxide führen bevorzugt am Rand zu ausgeprägten Signalveränderungen und demarkieren den Tumor zum umgebenden Hirnparenchym. Die dunklen Flecken außerhalb, aber auch innerhalb des Gehirns entsprechen Luftbläschen des in Agarose eingebetteten Gehirns (9,4 T, GRE, TR 100 ms, TE 25 ms, Flipwinkel 20°).

Die Tumorperipherie zeigte sich immer hypointens zum umliegenden Hirnparenchym, bedingt durch die hohe Ansammlung des superparamagnetischen Kontrastmittels (T_2^* und T_2 -Verkürzung) im Tumorrand. Demgegenüber erschien das Zentrum des Tumors meist relativ heterogen mit Arealen verstärkter Kontrastmittelansammlung und Regionen mit weniger starken KM-Ansammlungen. Auf Grund des hohen Kontrastes zwischen der Tumorperipherie und dem anliegenden Gehirn ließen sich leicht 3D-Rekonstruktionen des gesamten Tumors anfertigen; diese zeigten häufig einen insgesamt lobulierten Tumor, der sich zum einen im Stichkanal der Injektionskanüle ausbreitete und zum anderen einen meist mehr runden Tumoranteil dort hatte, wo primär die Tumorzellen injiziert wurden. Solche 3D-Rekonstruktionen des Tumors ermöglichen, gut die gesamte Tumorausbreitung zu erfassen, und stellten einen Bezug zu den anatomischen Strukturen in der Nachbarschaft her. (Abb. 28) (251).

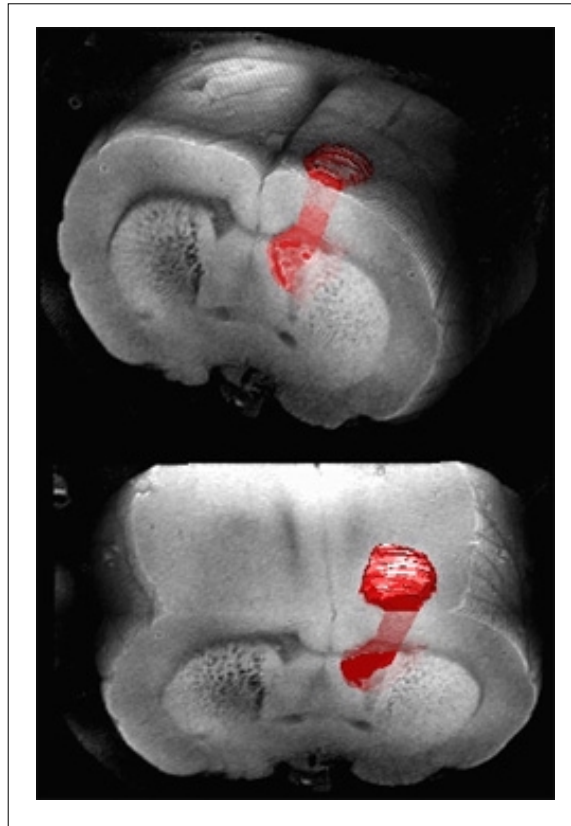


Abb. 28.: 3D-Rekonstruktion eines implantierten Tumors

Die dreidimensionale Oberflächen/Volumenrekonstruktion eines Rattenhirnes 24 hrs nach Eisenoxidgabe. Die Regionen mit MION-Aufnahme wurden rot koloriert und spiegeln das bilobulierte Tumorwachstum innerhalb des Rattenhirns wider.

5. 3. 2. Histologie

Wie in Kapitel 3. 3. 2. bereits beschrieben, zeigten sich auch in dieser Untersuchungsreihe große Tumoreale, in denen Eisenoxide eindeutig intrazellulär nachweisbar waren. Dabei korrelierte die Anzahl der Gliomzellen, welche Eisenoxide aufgenommen hatten, mit der Blutgefäßdichte: in der Tumorperipherie war die Tumolvaskularisation weitaus höher, hier zeigten sich auch dementsprechend mehr intrazelluläre Eisenoxidansammlungen. Dies steht in Korrelat zu dem signalarmen Ring in der Tumorperipherie in den MR-Untersuchungen. Immer wieder zeigten sich Tumorausläufer in das benachbarte gesunde Gehirn, häufig entlang von Tumorgefäßen, bei denen die Tumorzellen Eisenoxide intrazellulär aufgenommen hatten (Abb. 29).

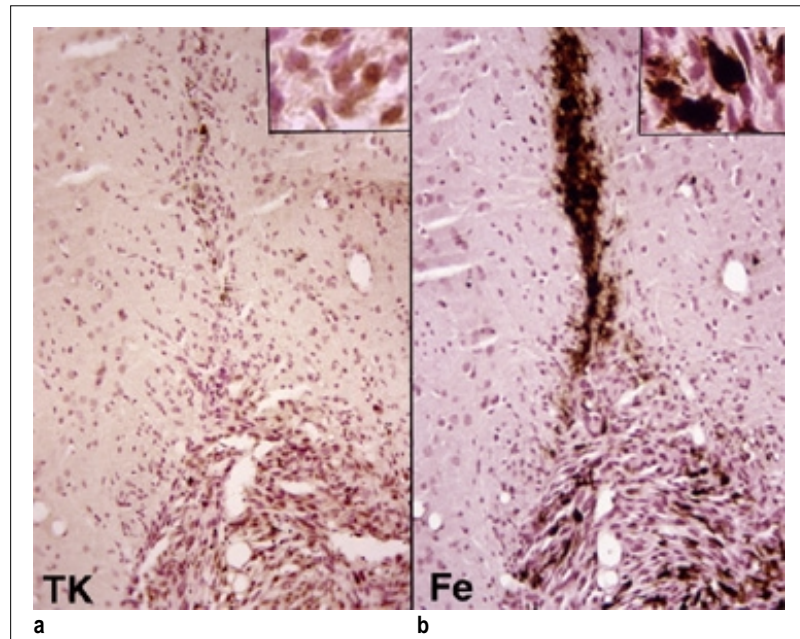


Abb.29.: Mikroskopische Tumorausbreitung des 9L-Glioms

Tyrosinkinase (TK)-Färbung (a) und DAB-verstärkte Eisenfärbung (b). (Vergrößerung X 200). Der Tumor breitet sich fingerförmig in das umgebende Hirn aus. Die Vergrößerungen rechts oben (X 400) zeigen die TK-Expression der Tumorzellen (a) und die Eisenaufnahme in die Zellen (b).

Dabei waren TK-positive Tumorzellen eindeutig von nicht neoplastischen, TK-negativen Zellen histologisch zu differenzieren. Solche eisenbeladenen Mikrometastasen waren bis zu 300 µm von der eigentlichen Tumormasse entfernt zu finden. Andererseits zeigten sich auch in dieser Untersuchungsreihe immer wieder Eisenansammlungen, die sich eindeutig interstitiell extrazellulär befanden.

5. 3. 3. Datenanalyse/Morphometrie

Es wurden insgesamt jeweils 27 MR-Schnitte und 27 histologische Vibratom-Schnitte morphometrisch analysiert. Die Schnitte entsprachen einander bezüglich der Schnittdicke und der anatomischen Lokalisation. Die durchschnittliche Tumorfläche ausgedrückt in Prozent und bezogen auf die Hirnoberfläche betrug in den HE/TK-gefärbten Schnitten $15,2 \pm 3,2$ % verglichen mit $15,5 \pm 2,8$ % bei den MR-Aufnahmen. Dies ergab einen Korrelationskoeffizienten zwischen den histologisch bestimmten und der kernspintomographisch ermittelten Tumorgröße von $r^2 = 0,89$ (Abb. 30).

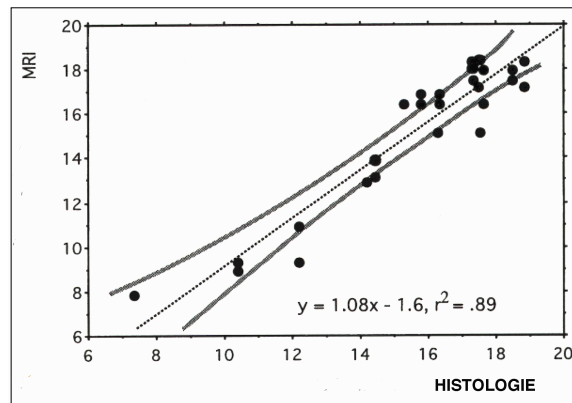


Abb. 30.: Korrelation zwischen MRT und Histologie

Die Ausdehnung des Hirntumors (in %, bezogen auf die Gesamtfläche des Gehirns) in einem 86 µm dicken Schnitt, gemessen in den MR-Aufnahmen (vertikale Achse) und in den histologischen Schnitten (horizontale Achse).

5.4. Diskussion

Der Tumorgrenze zum gesunden Hirngewebe wurde in der vorliegenden Untersuchung besondere Beachtung geschenkt, da diese Region mit der zur Zeit verfügbaren MR-Technik (einschließlich Gd-DTPA) nicht zufriedenstellend dargestellt werden kann und andererseits gerade von den infiltrierenden Zellen an der Tumorperipherie neues Tumorwachstum in die Umgebung ausgeht. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, wie sich der Tumorrand nach Gabe von Eisenoxidpartikeln darstellt und ob die intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxiden in die Tumorzelle selbst, wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, eine bessere Demarkierung dieser Tumoren zur Tumorumgebung ermöglicht. Methodisch wurde dies mit hochaufgelöster MRT („MR-Mikroskopie“) untersucht.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich die Gliome kernspintomographisch in T2-gewichteten Sequenzen im Randbereich deutlich hypointens, was mit der erhöhten Vaskularisation in der Tumorperipherie zu erklären ist. Diese Signalverminderung kommt durch vermehrte Eisenoxidakkumulation zustande, wobei das Eisen in drei verschiedenen Gewebekompartimenten zu finden ist: intravaskulär, intrazellulär, aber auch vermehrt extrazellulär in der Umgebung der Tumorgefäße. Obwohl sich in dem untersuchten Modell morphometrisch eine gute Korrelation zwischen histologisch ermittelter Tumorgöße und der Größe des Tumors im MR-Bild zeigte, dürfte gerade der nachweisbare *extrazelluläre* Eisenoxidanteil in vivo an einem größeren Tumor die

eigentliche TumorgroÙe verfälschen. Egelhof und Mitarbeiter verglichen ebenfalls experimentell bei einem C6-Gliom die Tumorausdehnung nach Eisenoxidgabe mit der nach Gd-DTPA-Injektion. Die Autoren ermittelten eine Überbetonung der eigentlichen TumorgroÙe nach Eisenoxidgabe um den Faktor 1,5 bzw. 2,1, abhängig von der applizierten Eisenoxiddosis (252). Verglichen mit der TumorgroÙe nach Gd-DTPA-Gabe waren die Eisenoxid-markierten Tumore um den Faktor 1,3 bzw. 1,9 größer. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen die Tumorgrenze lichtmikroskopisch am HE gefärbten Schnitt festgelegt, was insofern problematisch ist, da so Tumorzellen fern der Tumormasse nicht sicher von nicht-neoplastischem Gewebe differenziert werden können; dies kann zur Unterschätzung der eigentlichen Tumorausdehnung führen. Demgegenüber wurde in den vorliegenden Untersuchungen die Tumorgrenze anhand der TK-Expression der Gliomzellen festgelegt, welche eine sichere Differenzierung neoplastischer von normaler Glia erlaubt. Dennoch ist davon auszugehen, dass gerade der extrazelluläre KM-Anteil den rein tumorzellbezogenen KM-Anteil gewissermaßen „überdeckt“ und so eine Überbetonung der wirklichen TumorgroÙe durch die MRT – auch nach Gabe eines zellspezifischen KM - bewirkt. Eine solche Überbetonung der eigentlichen TumorgroÙe kann auch durch die Phagozytose der Eisenoxidpartikel durch Makrophagen und Mikroglia in der Tumorumgebung verursacht werden. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit der Einfluss des Eisenoxidanteiles im Zellinterstitium gegenüber dem intrazellulären Anteil, z. B. durch die Wahl eines geeigneten Untersuchungszeitpunktes, auch in dynamischen Untersuchungen verringert werden kann. Allerdings kann es auch zu einer Unterschätzung der eigentlichen Tumorausdehnung gerade dann kommen, wenn trotz Tumorzellinvasion die BHS/BHTS in einigen Tumorregionen noch intakt ist und das KM so die Tumorzellen nicht erreichen kann.

Die angewandten experimentellen Gliome (C6, 9L) sind makroskopisch in der Regel zum umgebenden Hirngewebe scharf demarkiert und imitieren, was die Schärfe des Tumorrandes angeht, eher Hirnmetastasen als die mehr invasiv wachsenden menschlichen Gliome. Gegenwärtig existiert leider kein Tumormodell, welches bezüglich des Invasionsverhaltens exakt dem menschlichen Glioblastom entspricht. Auch andere Gliom-Zelllinien (F98, CNS1, RG2) weisen, verglichen mit dem menschlichen Gliom, nicht solche invasiven Wachstumseigenschaften auf (eigene, nicht publizierte Untersuchungen) (253). Allerdings zeigen sich, insbesondere beim 9L-Gliom, histolo-

gisch immer wieder unscharf abgegrenzte Areale, in denen die Tumorzellen infiltrativ in das gesunde Gewebe migrieren, wobei sich erstaunlicherweise kleine Tumorzellinseln auch kontralateral, in der primär nicht betroffenen Hirnhemisphäre fanden. Dabei ließ sich zeigen, dass bei den angewandten experimentellen Gliomen die Tumorzellen zunächst hauptsächlich entlang der Blutgefäße in das umgebende Gewebe migrieren und somit potentiell mit systemisch gegebenen tumorzellspezifischen Kontrastmitteln erreichbar wären. Obwohl einige dieser abgelegenen Tumorzellen auch Eisenoxide akkumulierten, konnte doch ein großer Teil dieser versprengten Tumorzellinseln nicht erreicht werden. Ein Problem stellt möglicherweise auch hier die BHS/BHTS dar, die in diesem frühen Stadium der Tumorzellinvasion noch intakt ist und eine Passage der Eisenoxide verhindert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass hochauflösende MR-Mikroskopie in Kombination mit einer langzirkulierenden Eisenoxidpräparation geeignet ist, die Tumorausdehnung zu visualisieren. Obwohl Eisenoxide intrazellulär in die Tumorzelle und in Tumor-assoziierten Makrophagen aufgenommen werden, stellt gegenwärtig jedoch insbesondere der extrazelluläre, im Zwischenzellgewebe abgelagerte KM-Anteil ein Problem dar, wodurch die eigentliche Tumorausdehnung verfälscht werden kann. Die beobachteten markanten Signalveränderungen im Tumorrandbereich sind auf eine Kombination aus noch intravaskulärem, intrazellulärem, aber auch extrazellulärem Eisenoxid zurückzuführen.

6. Untersuchungen zur Blut-Hirn-Tumor-Schranke

6. 1. Fragestellung

Es konnte kürzlich an experimentellen Gliomen gezeigt werden, dass die intraarterielle Injektion von Bradykinin oder Bradykinin-Analoga zu einer temporären Öffnung der Blut-tumorschranke mit konsekutiver Steigerung der Zufuhr bestimmter Pharmaka unterschiedlicher Molekülgröße in den Tumor führt (254). In dem Projektabschnitt sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die selektive Öffnung der Blut-tumorschranke den Transport von Eisenoxiden in den Tumor steigern kann.

6. 2. Material und Methoden

6. 2. 1. Modell

Männliche F-344-Ratten (n=10, Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA, USA) mit einem Gewicht zwischen 200-300g wurden mit einer intraperitonealen Injektion eines Gemisches von 12,5 mg Ketamin (Ketalar, 100 mg/ml) und 2,5 mg Xylazin (Rompun, 20 mg/ml) in 0,5 ml NaCl (0,9%) anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) fixiert. Nach einem Hautschnitt im Bereich der Mittellinie über dem Bregma wurde ein Bohrloch in die Kalotte 1 mm anterior und 2 mm lateral des Bregmas angelegt und mit einer 10µl Spritze (Hamilton, Reno, NY, USA) 2µl der 9 L-Zellsuspension (4×10^4 Zellen in DMEM) in das Putamen in einer Tiefe von 4 mm von der Dura entfernt injiziert. Die 9L-Zelllinie war transfiziert und exprimierte β -Galaktosidase (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von X. O. Breakfield, Molecular Neurogenetics Unit, Neuroscience Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten injiziert und die Nadel über denselben Zeitraum hinweg zurückgezogen. Das Bohrloch wurde mit Knochenwachs (Ethicon, Inc., Sommerville, NJ, USA) verschlossen und die Haut genäht.

Die Tiere wurden 10 ds nach Tumorimplantation erneut anästhesiert (wie oben beschrieben). Um die Zufuhr der Eisenoxide in das Tumorgewebe zu maximieren, wurde bei 10 Tieren unmittelbar vor der MION-Injektion eine kürzlich beschriebene Methode zur temporären Öffnung der Blut-tumorschranke angewandt (254). Durch einen Mittellinienschnitt wurde die rechte A. carotis

communis im Bereich der Bifurkation freigelegt. Die A. pterygopalatinae und proximale Äste der A. carotis externa wurden ligiert, ebenso die A. carotis externa 1cm distal der Bifurkation. Ein Yasargil-Klip wurde temporär am proximalen Teil dieser Arterie angebracht und ein Polyurethan-Katheter (PE 10) eingeführt und fixiert. Nach Entfernung des Klips wurde über diesen Katheter zunächst Bradykinin-Acetat mit einer Infusionspumpe (Medfusion Syst., Norcross, GA; 10µg/kg über 10 Minuten) oder NaCl retrograd in die A. carotis interna der tumortragenden Hemisphäre injiziert, unmittelbar gefolgt von einer Bolus-Injektion MION (10mg Fe/kg MION). Es wurden 2 Gruppen gebildet, die entweder Bradykinin und MION (n=5) oder NaCl und MION (n=5) erhielten. Bradykinin-Acetat (Sigma, St.Louis, MO, USA) war vorher in einer Konzentration von 25mg/ml in NaCl aufgelöst und unmittelbar bis kurz vor der Injektion auf Eis gelagert worden. Zur Injektion wurde die Lösung auf 37° C erwärmt. Nach Entfernung des Katheters wurde die A. carotis externa ligiert und die Haut verschlossen. Die Tiere wurden 12 hrs nach Injektion im MR untersucht.

6. 2. 2. MR-Technik

Alle 5 Tiere aus jeder Gruppe wurden 12 hrs nach experimenteller Öffnung der BTS kernspintomographisch untersucht: dazu wurden die Ratten erneut anästhesiert und auf einer Plexiglasplatte fixiert. Die MR-Untersuchungen wurden mit einem 1,5 -Tesla Magneten (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) durchgeführt, wobei eine 3-inch Oberflächen-spule benutzt wurde. Es wurden koronare T1-gewichtete SE-Sequenzen (TR 300 msec, TE 17 msec, 256x192 Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schnittdicke), koronare Protonen- und T2-gewichtete SE-Sequenzen (TR 1500msec, TE 40/80 msec, 256x128 Matrix, 8 cm FOV, 3mm Schnittdicke) gewählt.

6. 2. 3. Histologie

Unmittelbar nach der kernspintomographischen Untersuchung wurden die Tiere mit einer Überdosis Phenobarbital getötet und anschließend zuerst mit Kochsalz (250ml), dann mit gepuffertem Formalin (250ml, 10%) perfundiert. Die entnommenen Gehirne wurden über Nacht in Formalin nachfixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 6µm dünne Scheiben geschnitten (Reichert-Jung, Nussloch, Germany). Es wurden Eisenfärbungen nach Perls' angefertigt (Inkubation in 2% HCl und 2% Potassium Ferrozyanid) mit zusätzlicher Verstärkung durch DAB (Inkubation

für 30 Minuten in 0,5% Diaminobenzidine mit 1% H_2O_2) und Kernechtrot-Gegenfärbung (223). Zur sicheren Visualisierung von Tumorzellen wurden die Tumore histochemisch unter Benutzung von X-Gal Substrat gefärbt (224). β -Galaktosidase exprimierende Tumorzellen zeigen sich blau gefärbt, während normale Glia ungefärbt bleibt.

Zur Quantifizierung der MION-Aufnahme im Gewebe wurde eine Gruppe von jeweils 5 tumortragenden Tieren (9L) mit und ohne Bradykinin-Injektion histologisch miteinander verglichen. Die Auswertung wurde von zwei verschiedenen Untersuchern im Rahmen einer Blindstudie durchgeführt. Es wurden jeweils Areale im Zentrum und in der Peripherie des Tumors mit der dichtesten Eisenphagozytose ausgewertet. Dazu wurde bei einer Vergrößerung von X 400 jeweils die Anzahl der eisenhaltigen Tumorzellen - bezogen auf 1000 Tumorzellen -gezählt.

6. 3. Ergebnisse

6. 3. 1. MR-Morphologie

Kernspintomographisch konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen der Gruppe, welche mit Bradykinin behandelt wurde, und der Gruppe, bei der kein Bradykinin injiziert wurde, festgestellt werden. Ähnlich den in Kapitel 3. 3. 1. beschriebenen Veränderungen zeigten sich auch in dieser Untersuchung Tumore, welche bevorzugt in den T2 gewichteten Sequenzen zum Teil ringartig eine zentralarme Region in der Tumorperipherie aufwiesen mit einem signalintensiven Zentrum. Bei einigen Tieren zeigten sich eher homogene Signalverluste über den gesamten Tumor.

6. 3. 2. Histologie

Nach alleiniger intraarterieller Injektion von MION 46 in die A. carotis zeigte sich eine hohe Dichte von eisenpositiven Zellen in der Peripherie des Tumors ($43,3 \pm 8,0 \%$). Im Zentrum des Tumors waren weitaus weniger Zellen Eisen-positiv, (durchschnittlich $7,0 \pm 3,2 \%$). Nach Bradykinin-Infusion in die Arteria carotis und anschließender MION-Gabe war in der Tumorperipherie kein wesentlicher Unterschied zu erkennen: durchschnittlich $45,5 \pm 6,5 \%$ der Tumorzellen waren Eisen-positiv. Ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Eisen-positiven Zellen zwischen der Bradykinin/MION- und der MION-Gruppe zeigte sich in den zentralen Tumorabschnitten ($p < 0,01$): Nach Bradykinin-Injektion hatten $40,2 \pm 7,2 \%$ der Zellen im Tumorzentrum Eisen phagozytiert, während dieser Anteil bei alleiniger MION-Injektion weniger als 10% betrug (Abb. 31).

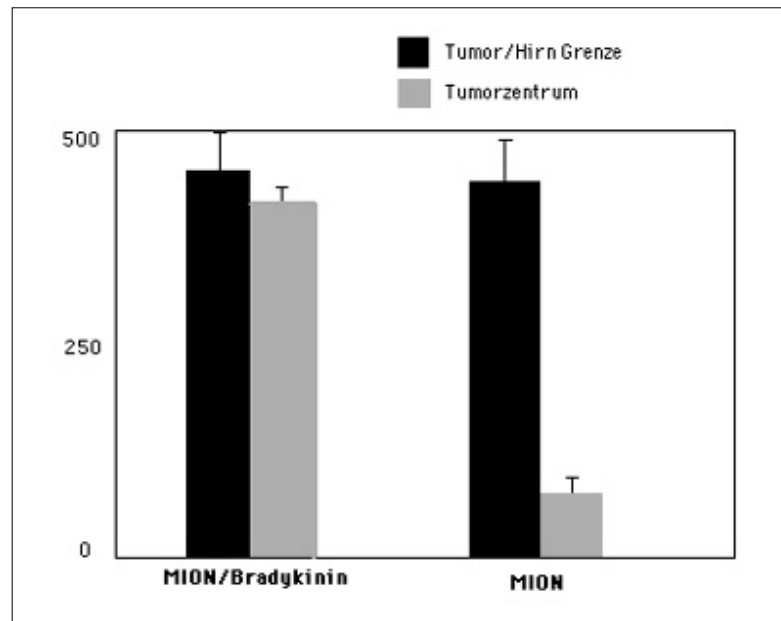


Abb. 31.: Einfluss von Bradykinin auf die BHTS

Die Y-Achse kennzeichnet die Anzahl der Eisen-positiven Zellen/1000 Tumorzellen. Bradykinin-Injektion bewirkt eine Vergrößerung der Eisenoxidphagozytose im Tumorzentrum, in der Tumorperipherie hat es keinen Einfluss.

Wesentliche Eisenoxidablagerungen im gesunden Hirngewebe in der Tumorumgebung zeigten sich nicht.

6. 4. Diskussion

Die BHS bzw. BHTS bei Gliomen ist, verglichen mit dem normalen Gehirn, für Makromoleküle durchlässig. Allerdings variiert die Permeabilität abhängig vom Tumortyp, auch ist die BHTS innerhalb eines Tumors äußerst heterogen. Diese unterschiedliche Permeabilität der Tumorgefäße stellt ein großes Problem für die Tumorbehandlung bei der Gabe von Chemotherapeutika, in jüngster Zeit aber auch bei der Darreichung von genetischem Material im Rahmen der Gentherapie bei Gliomen dar. Diese Heterogenität der BHTS ist aber auch ein Problem bei der Anwendung von diagnostischen Pharmaka (z. B. MR-Kontrastmittel), da diese den Tumor in Arealen mit intakter BHTS nicht erreichen.

Seit längerem existieren Techniken, die darauf beruhen, über osmotischen Stress für die Endothelzellen die BHS bzw. BHTS temporär zu öffnen. Diese wurden sowohl am Tiermodell (255, 256) als

auch am Menschen erprobt (257). Mit solchen Methoden wird für einen Zeitraum von ca. 2 hrs die BHS/BHTS innerhalb des Tumors, innerhalb des Gewebes welches an den Tumor grenzt, aber auch in Hirnregionen, welche weit von dem Tumor entfernt sind, geöffnet (258) (259). Damit gelingt es, Pharmaka in den Tumor aber auch in gesundes Hirnparenchym zu schleusen. Diese Beeinträchtigung des normalen Hirngewebes nach temporärer BHS-/BHTS-Öffnung, kann jedoch - als unerwünschte Nebenwirkung - zu neurologischen Symptomen (z. B. zerebraler Krampfanfall), aber auch zu nicht gewollten toxischen Effekten auf das gesunde Hirnparenchym führen. Bei experimentellen Gliomen bewirkt die temporäre Schrankenöffnung mittels Mannitol einen zehnfachen Anstieg von bestimmten BHS-Tracern innerhalb der Tumorumgebung, jedoch nur einen 25 %igen Anstieg im Tumorgewebe selbst (260).

Neben Mannitol als osmotisch wirksame Substanz sind eine Reihe von Pharmaka bekannt, welche ebenfalls die Permeabilität von Hirngefäßen und Hirntumorgefäßen beeinträchtigen, so Leukotriene C₄, Histamin, Interferon β , Tumornekrosefaktor α und Bradykinin (254). Inamura und Black konnten an RG2-Gliomen zeigen, dass nach Bradykinin-Gabe bestimmte BHS-Tracer unterschiedlicher Molekülgröße (z. B. Evans-Blue, HRP) innerhalb des Tumors um ein Vielfaches erhöht sind, während diese im umgebenden Hirngewebe nicht nachweisbar waren (254). Auch die vorliegenden Ergebnisse an einem 9L-Gliosarkom bestätigten diese Beobachtungen, in dem sich zeigen ließ, dass auch magnetische MR-Marker nach Bradykinin-Injektion im Tumorgewebe selbst um ein Vielfaches ansteigen, während das gesunde Hirngewebe in der Tumornachbarschaft nicht betroffen ist. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der Bradykinin Einfluss hauptsächlich im Tumorzentrum nachweisbar, während die Tumorperipherie unbeeinträchtigt bleibt (261). Neben Bradykinin wurden ähnliche Ergebnisse auch mit dem selektiven Bradykinin B₂-Agonisten RMP-7 beschrieben (262), auch präklinische Untersuchungen sind mittlerweile mit dieser Substanz beschrieben (263). Die Untersuchungen zeigen, dass Bradykinin und sein Agonist RMP-7 abhängig von der Dosis selektiv auf die Tumorgefäße, aber auch auf die Blutgefäße in der Tumorumgebung wirkt. Dabei werden bei hohen Bradykinin-Konzentrationen auch die Gefäße des normalen Hirnparenchyms bezüglich ihrer Permeabilität beeinträchtigt, während bei niedrigen Bradykinin-Konzentrationen ausschließlich eine Wirkung auf die Tumorgefäße erzielt wird (254, 264). Der Wirkungsmechanismus ist dabei möglicherweise über eine Aktivierung des Bradykinin

B₂-Rezeptoren auf den Endothelzellen zu erklären, wobei auch Nitric Oxide eine Rolle zu spielen scheint (265). Die Tatsache, dass Bradykinin keine Wirkung bei einem experimentellen Modell einer intrazerebralen LX1-Karzinommetastase zeigt (266), weist auf das Fehlen von Bradykinin B₂-Rezeptoren auf diesen Tumoren hin.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass mit pharmakologischen Methoden bei Gliomen selektiv auch die BHTS geöffnet werden kann, um Eisenoxide auch in Tumorregionen zu transportieren, die primär noch eine intakte BHTS haben. Inwieweit solche Strategien eine gezieltere MR-Bildgebung auch von Tumorregionen in der Peripherie, die z. Zt. mit Kontrastmittel noch nicht zu erreichen sind, bewirken, kann mit den vorliegenden Untersuchungen derzeit nicht sicher beurteilt werden und muss durch weiterführende Untersuchungen abgeklärt werden.

7. Untersuchungen zum Transferrin-Rezeptor Shuttle

7. 1. Fragestellung

Es ist bekannt, dass Tumorzellen in hoher Dichte Transferrinrezeptoren besitzen (267) (268). Darüber hinaus zeigen auch Hirnkapillaren einen sehr dichten Besatz an Transferrinrezeptoren. Physiologischerweise dienen diese Rezeptoren dazu, Eisen, welches an Transferrin gebunden ist, in das Hirngewebe zu schleusen. Vor diesem Hintergrund wurde ein Transferrinrezeptor-vermittelter Transport von Therapeutika über die intakte Blut-Hirn-Schranke beschrieben (269). In dem folgenden Teilprojekt soll am experimentellen Gliommodell und an Zellkulturexperimenten die Frage geklärt werden, ob die Konjugation von Transferrin an superparamagnetische Eisenoxide (USPIO) die Tumorzellspezifität dieser Kontrastmittel für Gliomzellen erhöht und ob diese Transferrinbindung den Eisenoxiden erlaubt, eine intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ohne dass die BHS/BHTS, wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben, vorher experimentell geöffnet wurde.

7. 2. Material und Methoden

7. 2. 1. Modell

Bei männlichen F-344 Ratten (n = 26) wurden, wie in Kapitel 3. 2. 1. beschrieben, intrazerebrale Tumoren erzeugt, indem entweder die Zelllinie 9L (n = 8) oder C6 (n = 17) intrazerebral implantiert wurde. Zusätzlich wurde ausschließlich für histologische Zwecke bei jeweils zwei Ratten eine C6-Zelllinie auf gleiche Weise implantiert, die mit X-Gal bzw. GFP transfiziert war. (Die GFP transfizierte Zelllinie war freundlicherweise von M. Synowitz aus dem Labor von H. Kettenmann, AG Zelluläre Neurowissenschaften, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, zur Verfügung gestellt worden).

7. 2. 2. Transferrin-Konjugation

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen wurde in dieser Untersuchungsreihe USPIO (UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxides) als Grundsubstanz an Stelle von MION verwandt. Bei USPIO handelt es sich um ein Eisenoxid, welches mit einer Carboxydextranhülle umgeben ist; im Gegensatz zu MION, welches aus einem einzelnen Eisenoxidkristall im Kern besteht, setzt sich USPIO aus multiplen zentralen Eisen-Kristallaggregaten zusammen.

An USPIO wurde Transferrin gekoppelt. Dazu wurden USPIO mit Periodat für die Bindung des Transferrin an die Carboxydextranhülle aktiviert. Diese aktivierten USPIO wurden dann an Transferrin kovalent gekoppelt und die Schiff'sche Base stabilisiert. Details der Synthese und der pharmakokinetischen Eigenschaften von Tf-USPIO sind an anderer Stelle beschrieben (270). (Tf-USPIO wurde freundlicherweise von M. Kresse, Institut für Diagnostikforschung GmbH an der FU Berlin, zur Verfügung gestellt). Zusammengefasst hatten die angewandten Tf-USPIO-Partikel einen Durchmesser von 36 nm (gemessen mit DLS), wobei der Kern einen Durchmesser von 5 nm (bestimmt durch TEM) aufwies. Für die R1-Relaxationen ergaben sich Werte von 23 l/mmol s und für die R2-Relaxationen von 52 l/mmol s (gemessen mit 0,47 T bei 37°C). Die Bluthalbwertszeit betrug bei der Ratte für diese Verbindung 17 min. Für die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden bei drei Tieren Tf-USPIO-Verbindungen benutzt, welche mit Texas-Red-Hydrazid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) markiert waren.

7. 2. 3. MR-Technik, Bildanalyse

Die Untersuchungen wurden an einem 2,35 T Magneten (Bruker BioSpec, Ettlingen), ausgestattet mit einem MSLX11-System und einer Birdcage-Spule mit einem Innendurchmesser von 6 cm, durchgeführt. Zur Bestimmung der Tumorgröße wurden die Tiere erstmals 12 bis 19 ds nach der Tumorinokulation im MR untersucht. Es wurde dazu jeweils eine T2-gewichtete Sequenz (TR/TE = 400/40 ms, RARE-Faktor = 2, FOV = 8, 4 Mittelungen) und eine T1-gewichtete Sequenz (TR/TE = 400/13 ms, RARE-Faktor = 8, FOV = 8, 4 Mittelungen) nach Injektion von Gd-DTPA (0,2 mmol/kg) in die Schwanzvene angewandt.

Abhängig von der Tumorgröße bei den initialen MR-Untersuchungen wurden die Tiere zwischen 14 und 20 ds nach der Tumorimplantation erneut im MR untersucht. Es wurde zunächst eine T2-gewichtete Sequenz (TR/TE 4000/40 ms) in transversaler Schnittführung angewandt. Anschließend wurden die Tiere mit den unterschiedlichen USPIO-Verbindungen i.v. injiziert. Eine Gruppe von Tieren erhielt 0,4 mmol/kg Körpergewicht Tf-USPIO (n=13) während eine Kontrollgruppe (n=6) in der gleichen Dosis unkonjugierte USPIO erhielt. Im Abstand von 0, 15, 30 und 60 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere erneut kernspintomographisch untersucht, wobei eine koronare T2-gewichtete Sequenz (s. oben) direkt durch die größte Tumorfläche gewählt wurde.

Ausschließlich für histologische Zwecke wurde bei einzelnen Tieren nur Transferrin (n = 3), Transferrin-Bodipy (n=3) oder Transferrin-Texas-Red-Hydrazid (n=2) injiziert.

Zur Bildanalyse wurden die MR-Aufnahmen auf einen Macintosh-Computer übertragen. Die Änderungen in der Signalintensität wurden in „regions of interest“ (ROI) jeweils im Zentrum des Tumors und im gesunden Hirnparenchym der kontralateralen Hemisphäre in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

Unmittelbar nach der letzten MR-Untersuchung wurden die Tiere durch eine Überdosis von Phenobarbital getötet, gleichzeitig über das linke Herz zunächst mit 250 ml NaCl und anschließend mit 250 ml Phosphat gepuffertem Formalin (10 %) perfusionsfixiert. Die Gehirne wurden entnommen, für 24 hrs in 10 % Formalin gelagert und anschließend tiefgefroren.

7. 2. 4. Histologie

Die tiefgefrorenen Gehirne wurden in 6µm dicken koronaren Schnitten im Kryostat geschnitten und mittels Eisenfärbungen und Hämatoxilin Eosin gefärbt (siehe Kapitel 2.2.3). Repräsentative Schnitte eines jeden Gehirns wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Transferrin (B-G24, Serotec; Deutschland) gefärbt. Details der immunhistochemischen Methode sind anderswo beschrieben (271). Zusammengefasst wurden die Schnitte mit 10 % Ziegenserum und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper gegen TF (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Nach Spülung wurden sie mit einem Ziegen-anti-Kaninchen-Serum bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, nach erneuter Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxydase-Komplex (ABC-Kit, Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Peroxydaseaktivität wurde anschließend durch Entwicklung mit DAB für 45 Sekunden sichtbar gemacht. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie von Tieren, die Tf-BODIPY, Texas-Red-Hydrazid-USPIO oder Bodipy-Tf-USPIO injiziert bekamen, wurden zusätzliche Gefrierschnitte angefertigt ohne jegliche Art von Gegenfärbung.

Die Gehirne mit den X-Gal-transfizierten Zelllinien als Tumorimplantate wurden für β -Galaktosidase gefärbt (224).

7. 2. 5. ICP-AES

Für die Zellkulturexperimente zur Aufnahme von Transferrin-konjugierten Eisenoxiden verglichen mit nicht-Transferrin-konjugierten Eisenoxiden wurde die Gliom-Zelllinie C6 und die Gliosarkom-

Zelllinie 9L benutzt. Die Zelllinien wurden unter den üblichen Kulturbedingungen in DMEM (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) mit 10 % fötalem Kälberserum unter wöchentlicher Passage kultiviert.

Für die Zellaufnahmeexperimente wurden die Zellen in 6225 cm³ Kulturflaschen am Wachsen gehalten, bis sie konfluieren. Anschließend wurden das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen in PBS gespült. Jeweils zwei Flaschen einer jeden Zelllinie wurden entweder mit 30 ml Medium, welches 1 mM USPIO (Gruppe 1), 1 mM Tf-USPIO (Gruppe 2) oder ausschließlich reguläres Medium enthielt (Gruppe 3), beschichtet. Die Flaschen wurden für eine Stunde bei 37 ° und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden trypsinisiert und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde den Zellen erneut 5 ml PPS zugegeben. Anschließend wurde die Eisenkonzentration in vitro mittels ICP-AES („induced coupled plasma atomic emission spectroscopy“) bestimmt (272, 273).

7. 3. Ergebnisse

7. 3. 1. Histologie

Die Tumore wiesen eine Größe zwischen 3 und 6 mm auf. In der HE Färbung zeigten beide Tumorarten einen meist scharfen Rand. Im Unterschied dazu zeigte sich in der X-Gal-Färbung, dass die Tumore an einigen Stellen infiltrativ in das umgebende Gehirn wuchsen, wobei sich die Tumorzellen hauptsächlich entlang von Gefäßen in das Gehirn ausbreiteten. Immun- histochemisch fand sich eine ausgeprägte Transferrin-Expression der Tumorzellen sowohl des C6-Glioms als auch des 9L-Gliosarkoms. (Abb. 32).

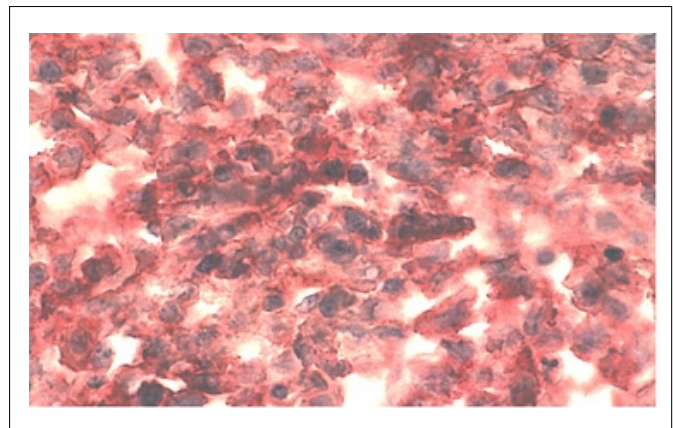


Abb. 32.: Transferrin-Immunhistochemie beim C6-Gliom

Die C6-Tumorzellen zeigen eine ausgeprägte Transferrinrezeptorexpression. Vergrößerung X 500.

Daneben waren sowohl Blutgefäße des normalen Hirnparenchyms als auch Tumorgefäße positiv für Transferrin (Abb. 33a). Auch der Plexus choroideus und das Ependym der Ventrikel zeigten eine deutliche Positivität in der Transferrin-Immunhistochemie (Abb. 33b).

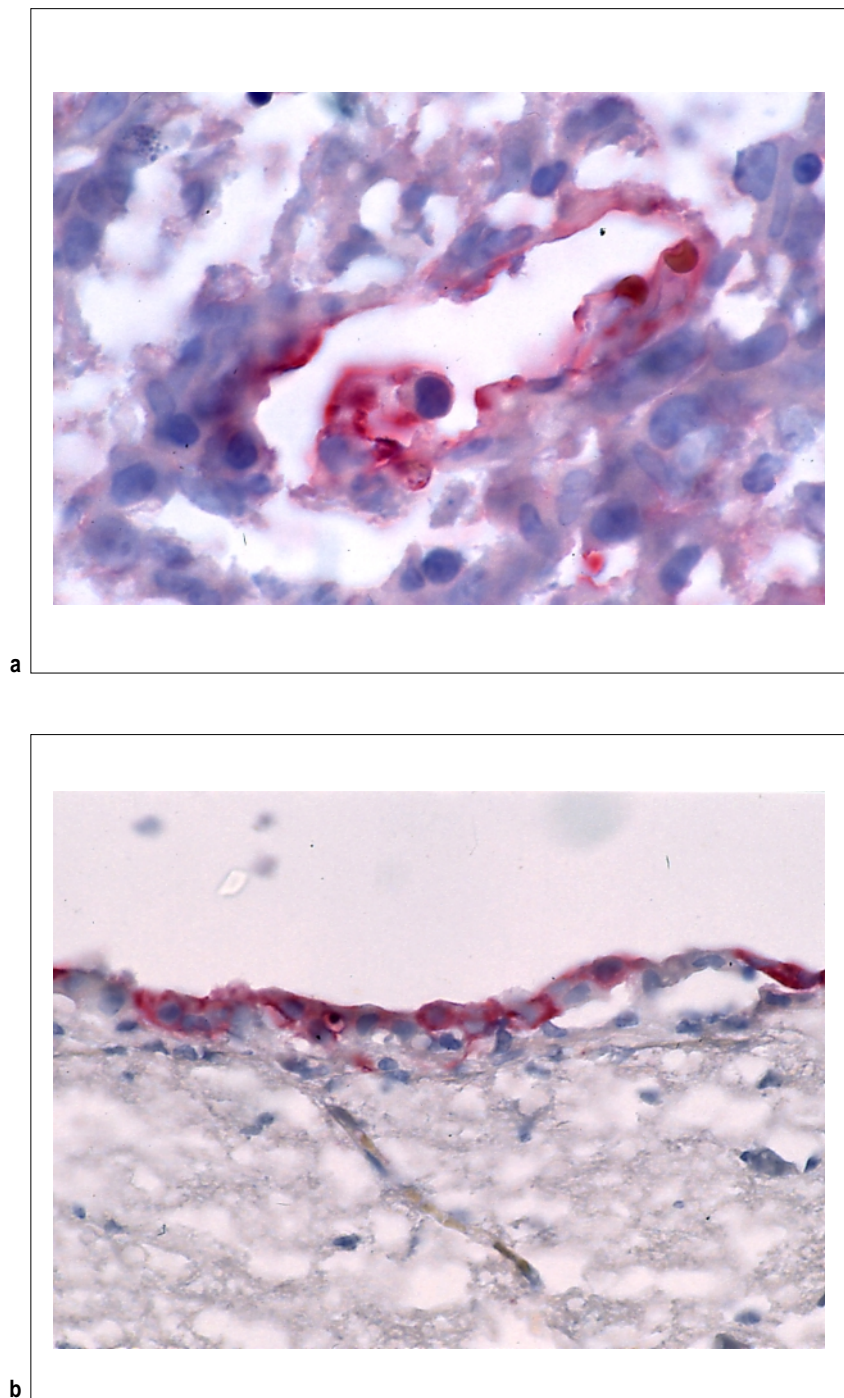


Abb. 33.: Transferrin-Expression auf den Gefäßendothelien der Hirngefäße und dem Ventrikependym
Transferrin-Expression auf einem (a) Hirngefäß und dem (b) Ventrikependym. Transferrin-Immunhistochemie. Vergrößerung X 600 bzw. X 400

In den Eisenfärbungen zeigte sich, dass hauptsächlich bei den Tieren, welche Tf-konjugierte Eisenoxide erhielten, große Eisenablagerungen in den Endothelzellen von Gefäßen sowohl innerhalb des Tumors als auch in der Nachbarschaft der Tumormasse zu finden waren (Abb. 34).

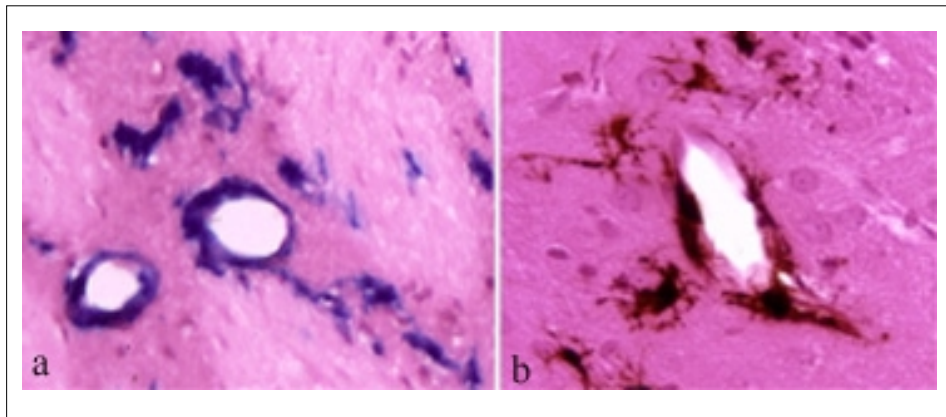


Abb. 34.: Eisenoxidaufnahme in den Gefäßendothelzellen

Ausgeprägte Eisenoxidaufnahme bei einem C6-Gliom in den Gefäßendothelien und in den benachbarten Tumorzellen nach Gabe von Tf-USPIO. β -Galaktosidase-Färbung (a), DAB-verstärkte Eisenfärbung (b). Vergrößerung X 500.

Allerdings hatten solche Endothelzellen auch normale Eisenoxide, welche nicht an Transferrin gebunden waren, intrazellulär aufgenommen. Darüber hinaus ließen sich Eisenablagerungen auch in den Tumorzellen selbst hauptsächlich im Bereich der Tumormasse nachweisen, vereinzelt waren aber auch Tumorzellen, welche entfernt von der Tumormasse waren, Eisen-positiv. Diesbezüglich zeigte sich, ohne allerdings dass dies genau quantifiziert wurde, kein wesentlicher Unterschied zwischen den Tieren, welche Transferrin-konjugierte Eisenoxide erhalten hatten und der Gruppe mit den nicht Transferrin-konjugierten Eisenoxiden. Innerhalb des normalen, nicht neoplastischen Hirngewebes ließen sich sowohl in der Gruppe der mit USPIO injizierten als auch der Tf-USPIO injizierten Tiere keine signifikanten Eisenoxidablagerungen finden.

Immunfluoreszenzmikroskopisch bestätigten sich diese Ergebnisse. Eisenoxide waren ausschließlich im Bereich in Tumorregionen zu finden und nicht im normalen Gewebe. Auch einfaches, nicht an USPIO gebundenes Transferrin war nur innerhalb der Tumore und in den Gefäßendothelzellen, nicht jedoch im gesunden Hirnparenchym zu finden.

7. 3. 2. ICP-AES

Mittels ICP-AES wurde an den zwei Gliom-Zelllinien (9L und C6) quantitativ in vitro die intrazelluläre Eisenaufnahme nach Inkubation von USPIO (Gruppe 1) und Tf-USPIO (Gruppe 2) bestimmt und miteinander verglichen. In einer Kontrollgruppe (Gruppe 3) wurden die Zellen ausschließlich mit Zellkulturmedium inkubiert.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

C6-Zelllinie: Gruppe 1: 11,05 µg Fe
 Gruppe 2: 22,3 µg Fe
 Gruppe 3: 7,30 µg Fe

9L-Zelllinie: Gruppe 1: 8,85 µg Fe
 Gruppe 2: 31,6 µg Fe
 Gruppe 3: 5,25 µg Fe

Wurde die Gruppe 3 (physiologischer Eisengehalt innerhalb der Zelle) von den zwei anderen Gruppen subtrahiert, so ergab sich eine zusätzliche Eisenaufnahme für die zwei Zelllinien nach Inkubation mit den zwei Eisenoxidpräparationen von:

Eisenaufnahme C6: 3,75 µg Fe nach USPIO und 15,0 µg Fe nach Tf-USPIO-Inkubation

Eisenaufnahme 9L: 3,60 µg Fe nach USPIO und 26,35 µg Fe nach Tf-USPIO-Inkubation

Insgesamt wiesen also die C 6-Zellen nach Inkubation mit Transferrin-markierten USPIO eine 4-fach höhere Aufnahme auf, verglichen mit nicht gelabelten USPIO. Bei den 9 L-Zellen war diese Aufnahme von Transferrin-gelabelten USPIO sogar um das 7,3-fache erhöht (Abb. 35).

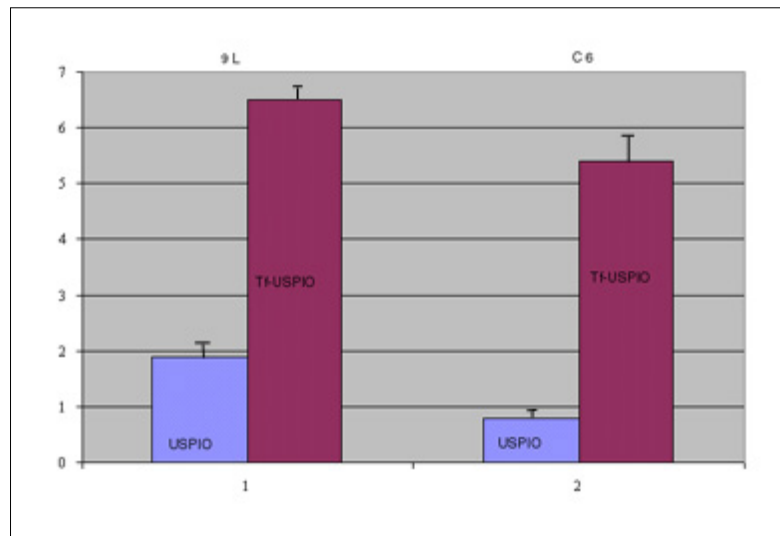


Abb. 35.: Tf-USPIO und USPIO Aufnahme in C6- und 9L-Zellen

Tf-USPIO wird, verglichen mit unkonjugiertem USPIO, in beiden Zelllinien in signifikant höherem Maße aufgenommen. ICP-AES-Messung.

7. 3. 3. MR-Bildgebung

Sowohl nach Injektion von USPIO als auch von Transferrin-markierten USPIO kam es in den Tumoren zu einem schnellen und lang anhaltenden Signalverlust. Auch im normalen Hirngewebe kontralateral des Tumors kam es zu einem Signalabfall, der jedoch, verglichen mit dem Tumorgewebe, deutlich geringer ausfiel.

Dieser Signalabfall nach Eisenoxid-Injektion zeigte sich in beiden Gruppen gleichermaßen, es ließ sich bei dem angewandten Untersuchungsprotokoll kein Unterschied im Signalverhalten zwischen den mit USPIO und den Tf-USPIO injizierten Tieren messen.

7. 4. Diskussion

In einem experimentellen Rattenmodell und in vitro sollte die Frage geklärt werden, ob die Konjugation von Transferrin an ultrakleine superparamagnetische Eisenoxide (USPIO) die Tumorzellspezifität dieser Kontrastmittel für Gliomzellen erhöht und ob diese Transferrinbindung

den Eisenoxiden erlaubt, eine intakte BHS zu überwinden, um z.B. an versprengte Tumorzellinseln zu gelangen, in deren Umgebung die BHS normalerweise noch nicht zerstört ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei den angewandten Gliomzellen C6 und 9L eine hohe Dichte an Transferrinrezeptoren zu finden ist. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von anderen Autoren, die sowohl bei verschiedenen Karzinomen, aber auch bei Sarkomen und Tumoren des hämatopoetischen Systems einen hohen Besatz an Transferrinrezeptoren auf Tumorzellen nachwiesen (268, 267).

Ferner ließ sich in den eigenen in vivo Untersuchungen eindeutig belegen, dass USPIO, wenn es an Transferrin gebunden wird, nach i.v.-Injektion in großen Mengen sowohl von den Gefäßendothelien als auch von den benachbarten Tumorzellen intrazellulär aufgenommen werden. Quantitative Zellkulturuntersuchungen an jeweils einer C6- und 9L-Zelllinie ergaben eine 3.3 bzw. 6.9 fach höhere Aufnahme von Transferrin konjugierten Eisenpartikeln, verglichen mit unkonjugierten Partikeln, die in wesentlich geringerem Maße aufgenommen wurden. Diese deutlich höhere intrazelluläre Aufnahme der Transferrin-gelabelten Partikel aus den in vitro Untersuchungen fand jedoch kein Korrelat in den entsprechenden MR-Untersuchungen: unabhängig ob mit oder ohne Transferrin führte die i.v. Injektion von USPIO innerhalb der Gliome zu einer ausgeprägten Signalminderung, wie es auch schon aus vorangegangenen Untersuchungen mit ungebundenen Eisenoxidpartikeln bekannt war (s. Kapitel 3). Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Kresse und Mitarbeitern, die bei einer Karzinom-Zelllinie in vitro ebenfalls eine deutlich höhere intrazelluläre Aufnahme von Tf-gebundenen Eisenoxidpartikeln fanden, jedoch – im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen - gleichzeitig auch in den MR-Untersuchungen einen signifikant stärkeren Signalverlust nach Injektion der Tf-gelabelten Partikel beobachteten (207). Allerdings handelt es sich bei der angesprochenen Studie um Untersuchungen an Karzinomen, welche in die Flanke von Tieren implantiert wurden. Insbesondere die fehlende BHS/BHTS unterscheidet dieses Model von den eigenen Untersuchungen und dürfte in diesem Zusammenhang eine nicht unwesentliche Bedeutung haben. Dennoch handelt es sich bei den eigenen Untersuchungen diesbezüglich nur um erste Ergebnisse, insbesondere die z. T. gegensätzlichen Ergebnisse zu den erwähnten Untersuchungen anderer sollten Anlass sein, diesen experimentellen Ansatz in modifizierten, insbesondere dynamischen MR-Untersuchungen, weiterzuführen.

Auch auf den Endothelzellen von Hirnkapillaren befinden sich Transferrinrezeptoren in hoher Dichte (274, 275, 276), während sie auf Kapillaren außerhalb des Gehirns etwas weniger dicht gestreut sind (274). Physiologischerweise dienen diese Transferrinrezeptoren im Gehirn dazu, Eisen, welches an sein Transportprotein Transferrin gekoppelt ist, über die BHS in das Hirngewebe zu schleusen. Außerhalb des Gehirns ist ein solcher aktiver, Rezeptor vermittelter Transport nicht notwendig, da hier keine der BHS vergleichbaren Strukturen vorhanden sind und die Gefäße für eisenbeladenes Transferrin permeabel sind. Dass es sich bei dem Eisentransport in das Hirngewebe um Endozytose handelt, konnte sowohl durch in vitro (277) als auch in vivo Untersuchungen (278) gezeigt werden. Dabei wird das gebundene Transferrin innerhalb weniger Sekunden bis Minuten internalisiert (279, 280). Die Zahl der Rezeptoren auf den Endothelzellen des Gehirns ist mit 10^5 relativ hoch (281). Auch die vorliegenden Untersuchungen bestätigen eine starke Expression von Transferrinrezeptoren sowohl auf den Endothelzellen des Rattengehirns als auch auf den Endothelzellen innerhalb der implantierten Gliom-Zelllinie C6 und 9L.

Allerdings bestand eine dem Projekt zugrunde liegende Frage u.a. darin, inwieweit der beschriebene Transferrinrezeptorenbesatz genutzt werden kann, um die Invasionszone von Gliomen besser kernspintomographisch darzustellen. Im Anfangsstadium der Zellinvasion bei Gliomen ist die BHS/BHTS noch intakt. Die häufig in der Gefäßumgebung abgesiedelten ersten Tumorzellnester sind daher mit Gd-DTPA, welches die Gefäße nur bei erfolgter Schrankenstörung verlässt, noch nicht zu erfassen. Systematische Untersuchungen, ab welcher Stufe genau die Zellinvasion die BHS/BHTS beeinträchtigt und diese damit für Gd-DTPA passierbar ist, gibt es nicht. In der Vergangenheit wurde der Transferrinrezeptor als Shuttle benutzt, um meist therapeutische Pharmaka in Zellsysteme zu schleusen. So sind Arbeiten publiziert, in denen das Transferrinrezeptor vermittelte Transportsystem dazu benutzt wurde, um neuroaktive Peptide und Proteine über die BHS zu schleusen (269, 282). Auch weiß man, dass über den Transferrinrezeptor größere Moleküle wie IgG (Molekulargewicht 150 000 Da) geschleust werden oder zumindest an ihm binden (IgM, Molekulargewicht 900 000 Da) (280).

Die Umsetzung allerdings dieses bisher nur therapeutisch genutzten Konzeptes auch für diagnostische Zwecke war in den eigenen Untersuchungen nicht möglich. Es gelang nicht, Tf-USPIO über die intakte BHS/BHTS zu schleusen. Die Ursachen hierfür sind bislang unklar.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass die Konjugation von Tf an Eisenoxide die spezifische Aufnahme von solchen Eisenoxidpartikeln in die Tumorzelle und in die Endothelzellen von Gefäßen signifikant erhöhen kann. Dies kann Vorteile bei einer mehr spezifischen MR-Darstellung von Tumoren bringen, lies sich jedoch in der vorliegenden Studie an experimentellen Gliomen noch nicht zeigen. Auch lies sich die BHS/BHTS mit solchen Konjugaten nicht umgehen.

8. Untersuchungen zur Gliomangiogenese

8. 1. Fragestellung

Die Angiogenese spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Gliomen. Ausdruck hierfür ist, dass Gefäßveränderungen ein wesentliches Kriterium bei der histologischen Klassifikation und Grading dieser Tumoren sind. Ein Maß für die angiogenetische Aktivität des Tumors ist die Gefäßdichte; dementsprechend ist es wichtig, das genaue Verteilungsmuster und die Morphologie (z. B. Permeabilität) von Mikrogefäßen innerhalb des Tumors genau *in vivo* visualisieren zu können. Obwohl die MR-Angiographie eine effiziente, nicht-invasive Methode darstellt, ist es mit ihr derzeit nicht möglich, kleinste Tumorgefäße zu erfassen.

Gegenstand der Untersuchungen in diesem Projektabschnitt ist die *in vivo* Analyse der Vaskularisation von experimentellen Gliomen, wobei mittels MRT sowohl das vaskuläre Volumen der Tumoren als auch die Permeabilität der Tumormikrogefäße dargestellt werden soll. Insbesondere soll die Frage untersucht werden, inwieweit sog. Blut-Pool-Kontrastmittel bzw. die Kombination von Kontrastmitteln mit unterschiedlicher Molekülgröße geeignet sind, die regionale Tumervaskularisation und regionale Permeabilität der Tumorgefäße selektiv darzustellen.

8. 2. Material und Methoden

8. 2. 1. Modell

Männliche F-344-Ratten mit einem Gewicht zwischen 150-250g wurden entweder mit der Gliom-Zelllinie C6 (n=7) oder der Gliosarkom-Zelllinie 9L (n=18) inokuliert. Die C6-Zelllinie war transfiziert und exprimierte β -Galaktosidase. Details hierzu wurden bereits in Kapitel 3.2.1. näher beschrieben. Zwischen 12 und 16 Tage nach Tumorimplantation wurden die Tiere kernspintomographisch untersucht.

8. 2. 2. MR-Technik, Kontrastmittel und Bildanalyse

In einer ersten Gruppe (n=7) wurde das kleinmolekulare KM *Gd-DTPA* (Gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic-acid, Magnevist[®], Schering AG, Berlin) in Kombination mit dem makromolekularen KM *MPEG-PI* (*Methoxy Polyethylene Glycol-Poly-L-Lysine*)-*GdDTPA* angewandt. Durch aufeinanderfolgende i.v. Bolusinjektion zunächst des großmolekularen und anschließender Injektion des kleinmolekularen KM wurde bei den Tumoren die regionale

Tumervaskularisation und die Permeabilität der Tumorgefäße kernspintomographisch untersucht.

Dazu wurden Tiere mit einem implantierten C6-Gliom untersucht. Die MR-Untersuchungen wurden an einem 1,5 -T Magneten (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) durchgeführt, wobei eine 3-inch-Oberflächenspule benutzt wurde. Für die MR Untersuchungen wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital (65mg/kg) anästhesiert und auf einer Plexiglasplatte fixiert. Die KM wurden jeweils im Bolus gespritzt und anschließend dynamische MR-Untersuchungen durchgeführt. Nach einem sagittalen Lokalizier (FSPGR) durch den Tumor wurden zunächst T2-gewichtete axiale Sequenzen angefertigt (FSE, TR/TE=200/105ms). Anschließend wurden axiale Präkontrast-Aufnahmen (FSPGR: TR/TE=19.8/4ms, 256x128 Matrix, 2 NEX) angeschlossen. Für 12 Schnitte betrug die Untersuchungszeit 41s. Nach intravenöser MPEG-PI-GdDTPA-Injektion (90 mmol Gd/kg) im Bolus wurden dynamische Postkontrast-Aufnahmen unmittelbar über insgesamt 24 Serien wiederholt. Nach Injektion von Gd-DTPA (90 mmol Gd/kg) im Bolus wurde die Untersuchungsserie wiederholt.

Bei dem angewandten makromolekularen KM MPEG-PI-Gd-DTPA handelt es sich um ein Polymer, welches von A. Bogdanov synthetisiert und von A. Bogdanov (Center for Molecular Imaging Research, Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Es zeichnet sich durch eine lange Bluthalbwertszeit (bei Ratten ca. 36 hrs) bei hohem Molekulargewicht (MW 560 kDa, Molekülgröße ca. 10 nm) und seine geringe toxische Wirkung aus. Die pharmakokinetischen und magnetischen Eigenschaften dieses KM sind eingehend untersucht und beschrieben (283). Dieses KM ist bisher nicht klinisch zugelassen.

Demgegenüber ist Gd-DTPA durch ein wesentlich geringeres MW von 0,583 kDa gekennzeichnet und seit langem klinisch zugelassen (Molekülgröße < 3 nm, Bluthalbwertszeit bei der Ratte ca. 12 min.) (284, 285). Während bereits 50% dieses kleinmolekularen Markers das Gefäßsystem innerhalb der ersten Blutpassage verlassen haben, ist dieser Anteil bei dem makromolekularen Marker als signifikant gering beschrieben (283).

Nach den MR-Untersuchungen wurden die MR-Bilder auf einen Macintosh-Computer übertragen. Die Änderungen in der Signalintensität wurden in „regions of interest“ (ROI) an verschiedenen Regionen innerhalb des Tumors (Tumorzentrum, Tumorperipherie, gesundes Hirnparenchym, arterielles Gefäß) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dazu wurde das Programm NIH Image

(Version 1.61) benutzt. Zusätzlich wurden Maps des vaskulären und des interstitiellen Volumens durch einfache Bildsubtraktion erstellt.

In einer zweiten Gruppe (n=5) wurde an 9L-Gliomen *Gd-DTPA* (Magnevist[®], Schering AG, Berlin) in Kombination mit dem makromolekularen KM *Gadomer-17[®]* angewandt. Auch hier wurde nach Injektion des großmolekularen und anschließend des kleinmolekularen KM die regionale Tumervaskularisation und die Permeabilität der Tumorgefäße kernspintomographisch analysiert.

Die Untersuchungen wurden an einem 2,35 T Magneten (Bruker Biospec) durchgeführt, welcher mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen und einer Birdcage-Spule mit einem Innendurchmesser von 6 cm als Sende- und Empfängerspule ausgestattet war. Für die Untersuchungen wurden die Ratten mit Ketamin/Rompun im Verhältnis 2:1 (100µl/100g) anästhesiert und auf einem halbierten Plexiglasrohr fixiert. Ähnlich wie oben beschrieben, wurden die KM jeweils als Bolus nacheinander im Abstand von 15 min während der dynamischen Messung in die Schwanzvene appliziert. Zunächst wurde mit einer T2-gewichteten RARE-Sequenz (TR/TE 2500/13 ms, RF 16) der Tumor und das umgebene Ödem lokalisiert. Für die dynamische Untersuchung wurde eine Inversion Recovery Snapshot FLASH-Sequenz (TR/TE/TI 5,3/3,2/200 ms, Matrix 128X128, FOV 7,82 cm) benutzt. Unmittelbar nach 10 s Baselineakquisition wurde Gadomer-17[®] (50 µmol/kg), nach 15 Minuten Gd-DTPA (50 µmol/kg) injiziert. Nach zwei Minuten wurde die Anzahl der Mittlungen für weitere 28 min von 1 auf 60 erhöht. Anschließend wurde eine ebenfalls koronare T1-gewichtete konventionelle, nicht dynamische Sequenz (RARE, TR/TE 400/13 ms, Matrix 256X256, FOV 6 cm) benutzt.

Bei dem angewandten makromolekularen Gadomer-17[®] handelt es sich um ein synthetisches Gadolinium-Chelat mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kD und einer Bluthalbwertszeit von 2,4 hrs. (persönliche Mitteilung Dr. H.-J. Weinmann). Dieses KM, welches noch nicht klinisch zugelassen ist, wurde freundlicherweise von Dr. H.-J. Weinmann (Schering AG, Berlin) überlassen.

Die MR-Daten wurden nach den Messungen auf einen Power Macintosh 7300/200 importiert. Das Signal-Zeit-Verhalten wurde mit dem Programm NIH Image 1.61 in verschiedenen ROIs des Rattenhirns (Tumorzentrum, Tumorperipherie, gesundes Hirnparenchym, arterielles Gefäß) ermittelt. Zusätzlich wurden Maps des vaskulären Volumens (VVF) und des interstitiellen Volumens (IVF)

durch Bildsubtraktion erstellt.

In einer dritten Gruppe wurde zur Visualisierung der Vaskularisation von 9L-Gliomen (n=5) nur *Gadomer-17®* angewandt. Die Tumore wurden mittels dynamischer MRT untersucht.

Die Untersuchungen wurden, wie die der Gruppe 2 und 4, ebenfalls an dem 2,35 T Magneten (Bruker Biospec, 6 cm Birdcage-Spule) durchgeführt, die Tiere wurden für die MR-Untersuchungen in gleicher Weise anästhesiert und gelagert.

Zur Lokalisation des Tumors wurde zunächst eine T2-gewichtete RARE-Sequenz (TR/TE 2500/13, RF 16) und eine T1-gewichtete RARE-Sequenz als Präkontrast-Aufnahme (RARE, TR/TE 400/13 ms, Matrix 256 X 256, FOV 6 cm) benutzt. Anschließend wurden die Tiere dynamisch unter Verwendung einer Inversion Recovery Snapshot FLASH-Sequenz (TR/TE/TI 5,3/3,2/200 ms, Matrix 128 X 28, FOV 7,82 cm) untersucht. Dazu wurde *Gadomer-17®* im Bolus injiziert, anschließend wurden im Abstand von jeweils einer Sekunde MR-Aufnahmen durchgeführt. Als Postkontrast-Aufnahme wurde die oben erwähnte T1-gewichtete Sequenz wiederholt.

Zur Bildanalyse waren Daten aus Voruntersuchungen nötig: Um die Kontrastmittelkonzentration in den Blutgefäßen messen zu können, wurden mit Hilfe von dynamischen Phantom-Durchfluss-Messungen das Signal in Abhängigkeit von der Kontrastmittelkonzentration gemessen und mit dem Produkt einer asymptotischen und einer abfallenden Exponentialfunktion angepasst (s. Kapitel 8.3.1.). Mit Hilfe eines pharmakokinetischen Modells, welches einen Nettofluss des KM zwischen zwei Kompartimenten definiert, wurde das vaskuläre Volumen CBV berechnet. Dabei gilt für die Extravasation des Kontrastmittels in das Interstitium folgende Ratengleichung:

$$\frac{dC_i}{dt} = P \frac{S}{V_i} (C_p - C_i), \quad (1)$$

wobei C_i die Kontrastmittelkonzentration im interstitiellen Raum, C_p die Kontrastmittel-Konzentration im vaskulären Volumen, P die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für das KM, S die Oberfläche des Blutgefäße und V_i das Volumen des interstitiellen Raumes ist. Durch die Annahme eines mittleren Gefäßdurchmessers \bar{r} und der Substitution $S=2V_b/\bar{r}$ mit V_b als Volumen des vaskulären

Raumes kann das relative vaskuläre Volumen berechnet werden. Dazu wurden aus den Bildern der dynamischen Sequenz die Signal-Zeit-Verläufe zweier Blutgefäße erstellt. Relative Perfusionsparameter wurden dadurch gewonnen, dass das MR-Signal während des ersten Durchgangs des Kontrastmittelbolus analysiert wurde, in dem eine Regressionsmethode unter Benutzung einer Gamma-Variat Funktion benutzt wurde:

$$C(t) = \alpha c_0 (t - t_0)^r \exp^{-k_y (t - t_0)}, \quad (2)$$

mit einer Proportionalitätskonstante α , c_0 der Kontrastmitteldosis, t_0 dem Zeitpunkt des Signalanstiegs bzw. -abfalls, r einem Exponentialfaktor und k_y der Ratenkonstante der Signalerholung. Das zerebrale Blutvolumen (CBV) ist annähernd proportional zur Kontrastmittelkonzentration und berechnet sich aus der Anpassung des Bolus mit Formel (2). Nach diesem Verfahren wurden pixelweise Maps mit einem Fortranprogramm berechnet, welche das Blutvolumen für jeden Pixel wiedergeben.

Die Berechnung der Permeabilitätsmaps ergibt sich aus Formel (1) unter Annahme eines mittleren Gefäßradius r (dieser Wert wurde aus der Histologie gewonnen), wobei die Gefäßoberfläche $S=2*CBV/r$ ist. Auf diese Weise wurde auch die Permeabilität (P) pixelweise berechnet und konnte ebenfalls für jeden Pixel innerhalb des Tumors als „Map“ dargestellt werden.

In einer vierten Gruppe ($n=8$) wurde zur MR-Darstellung der Vaskularisation von 9L-Gliomen ausschließlich eine Eisenoxidpräparation (SPIO, *DDM 128*) angewandt, die ebenfalls Eigenschaften eines Blut-Pool-KM besitzt. Auch diese wurden mittels dynamischer MRT untersucht.

Die Untersuchungen und auch die anschließende Bildanalyse wurden ebenfalls an einem 2,35 Tesla Magneten (Bruker Biospec) in gleicher Weise wie die der 3. Gruppe durchgeführt. Nach der T2-gewichteten Sequenz zur Lokalisation des Tumors wurden die Tiere dynamisch unter Verwendung einer Snapshot FLASH-Sequenz (TR 5,9, TE 3,2 ms, Kippwinkel 7°, Matrix 128 X 128, FOV 6,28 cm) untersucht. Dazu wurde *DDM 128* als Bolus injiziert, anschließend

wurden im Abstand von jeweils einer Sekunde Aufnahmen durchgeführt.

Bei DDM 128 (freundlicherweise überlassen von W. Semmler, Institut für Diagnostikforschung GmbH an der FU Berlin, jetzt DKFZ Heidelberg) handelt es sich um ein SPIO, welches auf Grund seiner Molekülgröße von ca. 60 kD ebenfalls zu den Blut-Pool-KM gezählt werden kann. Dieses Eisenoxid besteht aus einer Carboxydextranhülle und einem zentralen Eisenoxidkern. Details der Synthese und der pharmakologischen und magnetischen Eigenschaften dieser Verbindung sind an anderer Stelle im Detail beschrieben (286).

Bei allen vier Gruppen wurden unmittelbar nach der letzten MR-Untersuchung die Tiere durch eine Überdosis von Phenobarbital getötet, gleichzeitig über das linke Herz zunächst mit 250 ml NaCl und anschließend mit 250 ml Phosphat gepuffertem Formalin (10 %) perfusionsfixiert. Einzelne Tiere waren nicht perfusionsfixiert, sondern sofort durch eine Überdosis von Phenobarbital getötet worden. Die Gehirne wurden entnommen, für 24 hrs in 10% Formalin gelagert und anschließend tiefgefroren oder in Paraffin eingebettet. In ausgewählten Fällen wurde ein Teil des tumortragenden Gehirns nicht kryofixiert oder in Paraffin eingebettet, sondern für die Anfertigung von Vibratomschnitten zunächst in PBS-Puffer gelagert.

8. 2. 3. Histologie

Histologisch wurde bei ausgewählten Tieren aller Gruppen die Tumervaskularisation mittels Faktor VIII-Immunhistochemie (von Willebrandt-Jürgens) oder Lektin-Histochemie (Isolectin B4) histologisch dargestellt. Dazu wurde für die Endothel-spezifische Lektin-Färbung ein aus *Bandeiraea simplicifolia* isoliertes, Peroxidase markiertes Lektin (Sigma Chemie) benutzt, auch als Isolectin B4 bezeichnet. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden zunächst in Xylol (3 mal 15 min. in absteigender Alkoholreihe, 100, 96, 80, 70 %) entparaffiniert und anschließend in PBS-Puffer gespült. Nach Trypsinierung (0,1g Trypsin/100 ml H₂O) und erneutem Spülen in Spülpuffer (PBS) wurde die endogene Peroxidase in Methanol gestoppt. Anschließend erfolgte ein erneutes Spülen in Puffer. Die Endothelmarkierung wurde durchgeführt durch 90-minütige Inkubation der Schnitte mit dem Lektin (1:500) bei 37°C. Anschließend erneutes Spülen in Spülpuffer. Entwicklung der Schnitte in AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Fa. DAKO, Hamburg) für ca. 20 s. und Gegenfärbung mit Methylgrün. Anschließend wurden die Schnitte eingedeckelt.

Bei einem Teil der Schnitte wurden die Gefäße auch mit einem Antikörper gegen Faktor VIII (von Willebrandt-Jürgens, Fa. DAKO, Hamburg) immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurden die Schnitte in gleicher Weise wie oben beschriebenen vorbehandelt. Die endogenen Proteasen wurden durch Methanol (5 ml Methanol in 100µl H₂O₂) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Normalserum für 30 Minuten. Nach Spülung Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt 1:1000 in PBS) bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Anschließend erneute Spülung in PBS. Entwicklung in DAB und leichte Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Exemplarisch wurde bei einem Tier der 3. Gruppe die Gefäßdichte quantitativ morphometrisch vermessen, histologisch das CBV bestimmt und mit dem kernspintomographisch ermittelten Wert korreliert. Dazu wurden jeweils 10 Schnitte aus einem zwei Millimeter Tumor-tragenden Block im Kryostaten 6µm dick geschnitten, wie oben beschrieben mit Isolectin B4 gefärbt und morphometriert. Die morphometrische Auswertung dieser Schnitte erfolgte halbautomatisch (Leica Quantimed 600). Dazu wurde der Interhemisphärenspalt der Schnitte mit der Nord-Süd-Achse des Mikroskops abgeglichen. Anschließend wurde der Tumor Gesichtsfeld (entsprechend einem Pixel im MR) für Gesichtsfeld abgerastert, die Gefäße semiautomatisch markiert und die einnehmende Gesamtfläche der Gefäße mit einem Computerprogramm berechnet (Das Mophometrie-Programm wurde freundlicherweise von F. Schäper, Institut für Pathologie der Charité, zur Verfügung gestellt). Die Gefäßflächen der entsprechenden Gesichtsfelder der 10 Schnitte wurden gemittelt und mit der Schichtdicke (2mm) multipliziert und in Prozent ausgedrückt, daraus resultierte der berechnete histologische Wert für VVF. Dieser wurde mit dem radiologisch ermittelten CBV korreliert. Die Gefäßpermeabilität der Tumorgefäße wurde bei ausgewählten Tieren sowohl über die Verteilung von Evans Blue als auch immunhistochemisch über die Extravasation von Immunglobulinen unterschiedlicher Molekülgröße (IgG, Molekulargewicht 15000; IgM, Molekulargewicht 970 000) untersucht.

Evans Blue war einigen Tieren noch in vivo injiziert worden, die Extravasation in das Gewebe wurde an 80 µm dicken Vibratomschnitten überprüft.

Für die immunhistochemischen Färbungen mit AK gegen IgG und IgM wurden 6 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Zunächst wurden die Schnitte mit 10%igem normalen Ziegenerum in PBS 10 min und dann über Nacht bei Raumtemperatur mit dem primären Kaninchen- Antikörper (IgG, Fa. DAKO, Hamburg mit einer Verdünnung von 1:500; IgM, Fa. DAKO, Hamburg) mit einer

Verdünnung von 1:500) in PBS inkubiert. Nachdem die Schnitte mit Biotin-gebundenem Ziegen-Anti-Kaninchen-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert wurden, wurde anschließend die Reaktion mit einem Avidin-Biotin-Peroxydase-Komplex (ABC Kit, Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) durchgeführt. Die Peroxydaseaktivität wurde sichtbar gemacht, indem die Schnitte mit DAB (Sigma Chemicals) für 45 bis 60 sec inkubiert wurden.

Bei den Tieren der 4. Gruppe, welche USPIO bekommen hatten, wurde die intravaskuläre Lokalisation der Kontrastmittel bzw. deren Ablagerung im Gewebe histologisch überprüft. Dazu wurden ausgewählte Schnitte, wie unter 2.2.3. beschrieben, für Eisen gefärbt. Diese Tiere waren zuvor nicht perfundiert worden.

8. 3. Ergebnisse

8. 3. 1. MR-Bildgebung

Die physiologischen Parameter für Vaskularisation und Gefäßpermeabilität wurden nach den zeitabhängigen Signalanreicherungskurven bestimmt.

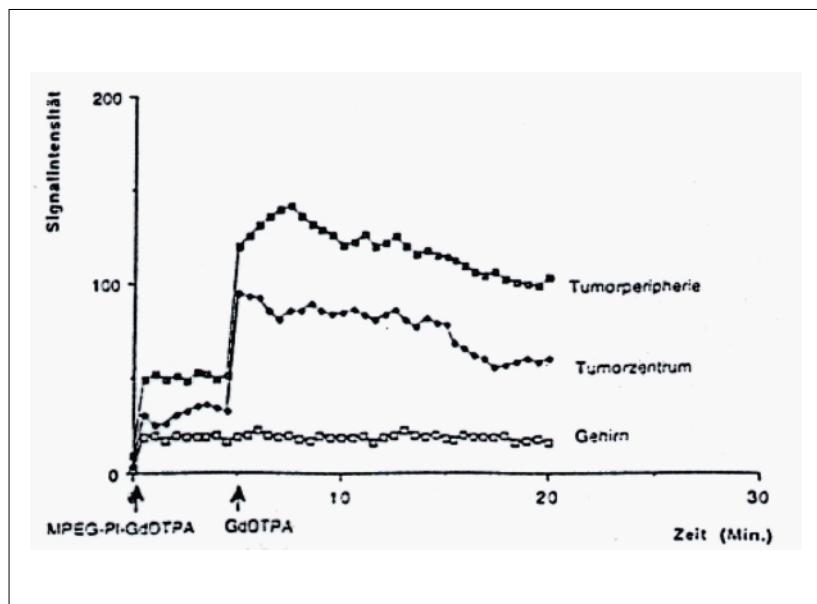


Abb. 36.: Signalzeitverlauf bei kombinierter MEPG-PI-Gd-DTPA und Gd-DTPA-Injektion

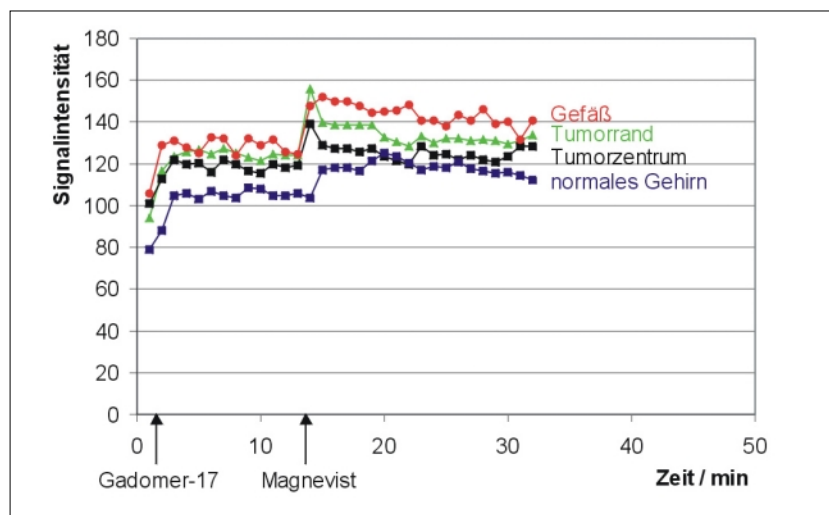
9L-Gliom nach Injektion zunächst von MEPG-PI-Gd-DTPA, gefolgt von einer Gd-DTPA-Injektion. Der erste Signalanstieg entspricht dem Intravaskulärraum und ist über die Zeit konstant; der zweite Signalanstieg spiegelt die Tumorpermeabilität wider, der folgende langsame Signalabfall entspricht dem Auswascheffekt im Extrazellulärraum. Der Tumor ist im Randbereich stärker vaskularisiert als im Zentrum. Das normale umgebende Hirngewebe ist geringer als der Tumor vaskularisiert, hier kein Nachweis einer BHS-Störung.

Abb. 36 zeigt den typischen Signal-Zeitverlauf nach MPEG-PI-Gd-DTPA und Gd-DTPA-Injektion (erste Gruppe) bei den C6-Tumoren. Das frühe Enhancement nach MPEG-PI-Gd-DTPA-Injektion reflektiert die Tumervaskularisation und ist über die Zeit konstantbleibend. Zu diesem Zeitpunkt ist das Gefäßvolumen mit Gd-DTPA vollständig gesättigt, da eine sehr hohe MPEG-PI-Gd-DTPA-Dosis benutzt wurde. Anschließende Gd-DTPA-Gabe führte zu erneuten Signaländerungen. Der dargestellte zweite Anstieg nach Gd-DTPA-Injektion ist auf erhöhte Gefäßpermeabilität zurückzuführen. Dies ließ sich histologisch über die Verteilung von Evans Blue und Immunglobulinen über das eigentliche Tumorareal hinaus bestätigen. Sowohl kernspintomographisch als auch histologisch zeigt sich eine klare Zeitabhängigkeit der Tumorgefäßpermeabilität von der Größe der Tumoren: Während die Permeabilität bei kleinen Tumoren gering ist, steigt sie deutlich mit zunehmender Tumorgroße. Der schnelle Abfall nach Gd-DTPA entspricht dem Auswascheffekt und der raschen Ausscheidung dieses KM über die Nieren.

Nach Gabe von Gadomer-17® in Kombination mit Gd-DTPA (zweite Gruppe) zeigten sich bei den 9L-Gliomen ähnliche Ergebnisse. Abb. 37 stellt den typischen Signal-Zeit-Verlauf unter Gabe dieser KM dar.

Abb. 37.: Signalzeitverlauf nach Gabe von Gadomer-17®, gefolgt von einer Gd-DTPA-Injektion

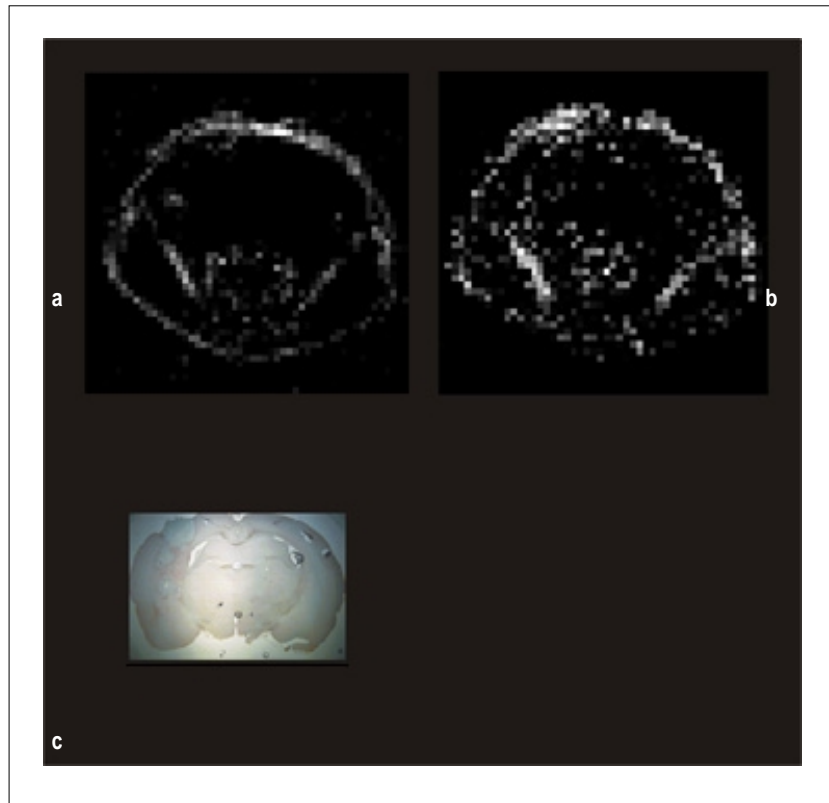
Entsprechend der Abbildung 36. spiegelt der erste Signalanstieg die Tumervaskularisation, der zweite Signalanstieg die Tumorgefäßpermeabilität wider.



Die Subtraktion des Grundsignals vom Signal nach Gadomer-17®-Gabe ergab Aufnahmen, die die vaskuläre Volumen-Fraktion (VVF) der Tumoren widerspiegeln, die Subtraktion des Signals nach Gadomer-17®-Gabe vom Signal nach Gabe beider Kontrastmittel zeigte die interstitielle Volumen-Fraktion (IVF) des Tumors auf. Eine solche Kartierung eines Tumors für VVF und IVF ist in Abb. 38 wiedergegeben.

Abb. 38.: Vaskuläre Volumen-Fraktion (VVF) und interstitielle Volumen-Fraktion (IVF)

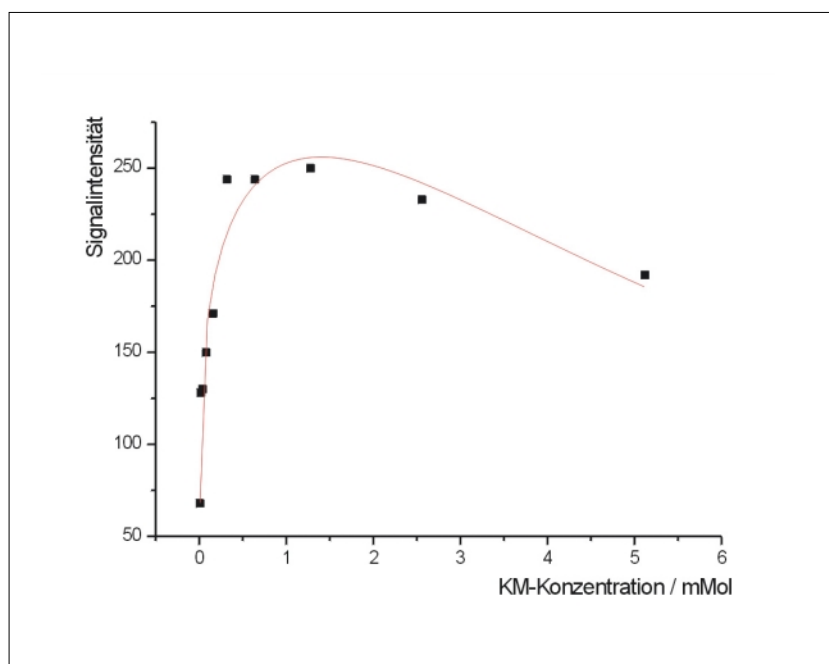
Subtraktionsbilder nach Gadomer-17®- und Gd-DTPA-Injektion charakterisieren die vaskuläre Volumen-Fraktion (VVF) (a) und die interstitielle Volumen-Fraktion (IVF) (b) von 9L-Gliomen. Entsprechender histologischer Schnitt (c)



In der Versuchsreihe zur dritten Gruppe bei alleiniger Gadomer-17®-Gabe wurden vorab dynamische Phantom-Durchfluss-Messungen durchgeführt, wobei dem Signal-Zeit-Verlauf ein Kontrastmittel-Zeit-Verlauf zugeordnet wurde (Abb. 39).

Abb.39.:Durchflussphantommessungen mit Gadomer-17®

Gemessenes und „angepasstes“ Signal in Abhängigkeit von der KM-Konzentration anhand eines dynamischen Durchflussphantoms unter Benutzung von Gadomer-17® als Kontrastmittel.



Die i.v. Injektion von ausschließlich Gadomer-17[®] in tumortragende Tiere, anschließender dynamischer MR-Bildgebung mit folgender mathematischer Berechnung des vaskulären Volumens (CBV) und der Permeabilität (P) erbrachte typische zeitliche Signalverläufe, wie sie in Abbildung 40 exemplarisch gezeigt sind. Die anfänglich erhöhte Signalintensität ist mit den Einschwingvorgängen der benutzten Sequenz zu erklären. Nach Kontrastmittelgabe ist im Gefäß der konzentrierte Bolus als Maximum im Signal zu sehen, welches sich nach Durchmischung und langsamer Extravasation anschließend angleicht. Der Tumor wird durch langsame Extravasation zunehmend kontrastiert.

Abb. 40.: Signalzeitverlauf nach Gabe von Gadomer-17[®]

Mit der angewandten Sequenz ist der Bolus in den untersuchten Kompartimenten als Signalanstieg zu erkennen, das Kontrastmittel diffundiert über die gestörte BHS über einen Zeitraum von wenigen Minuten in den Tumor.

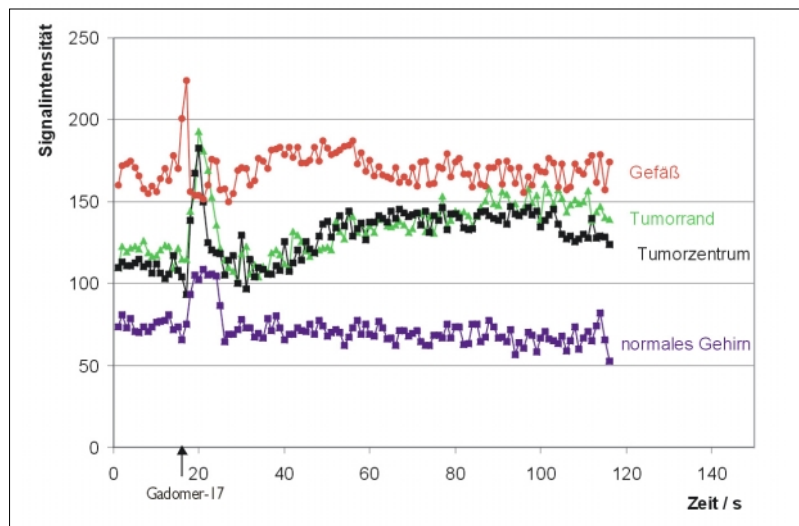
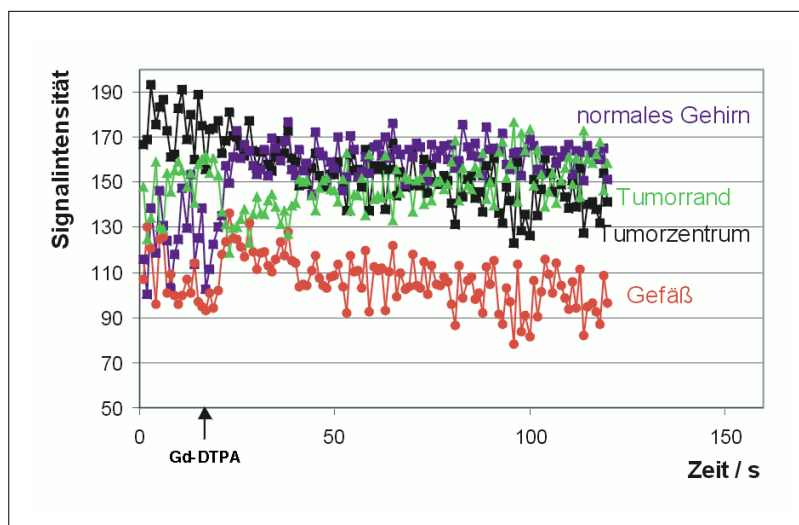


Abb. 41.: Signalzeitverlauf nach alleiniger Gd-DTPA-Gabe

Gd-DTPA diffundiert auf Grund seiner kleinen Molekülgröße sofort in den Tumor, der Bolus kann mit der angewandten Sequenz nicht aufgelöst werden.



Zum Vergleich ist in Abb. 41 der Signalverlauf einer Messung mit ausschließlicher Gabe des kleinen molekularen Gd-DTPA dargestellt.

Da Gd-DTPA wesentlich kleiner ist als Gadomer-17[®], extravasiiert es sofort und der Bolus ist mit den benutzten Sequenzen nicht mehr aufzulösen. Abbildung 42 stellt mathematisch berechnete MR-Maps zur Vaskularisation (CBV) und Permeabilität (P) der 9L-Tumoren dar. Das erhöhte CBV-Areal ist größer als das Areal der erhöhten Permeabilität, was zeigt dass das Enhancement der konventionellen MRT in diesem Fall hauptsächlich auf Kosten der Tumervaskularisation und nicht erhöhter Permeabilität geht.

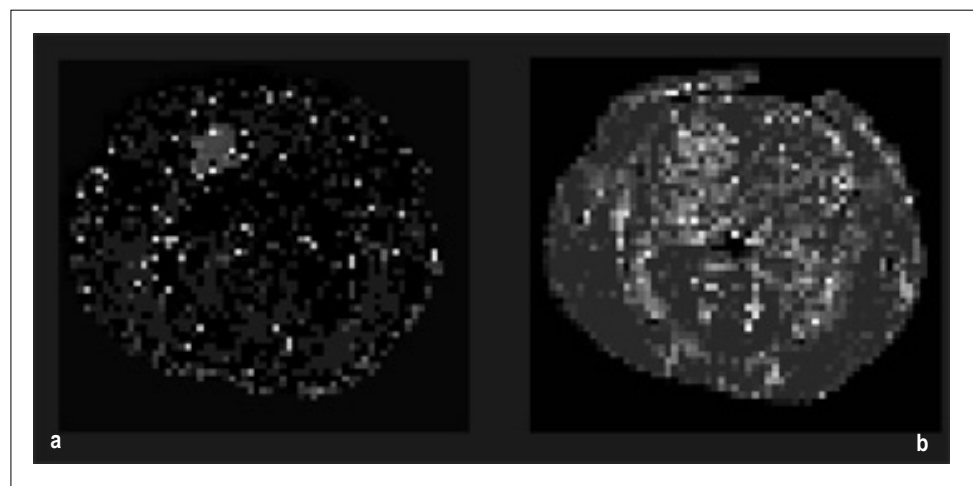


Abb. 42.: CBV- und P-Mapping beim 9L-Gliom mit Gadomer-17[®]

T1w-Sequenz nach Gadomer-17[®]-Gabe. Mathematisch berechnete Kartierung von P (a) und von CBV (b). Das Tumorareal mit erhöhtem P ist kleiner als das Tumorareal mit erhöhter Vaskularisation.

In der Versuchsreihe zur vierten Gruppe bei alleiniger DDM 128 Gabe wurden wie in der dritten Gruppe vorab dynamische Phantom-Durchfluss-Messungen durchgeführt, dabei wurde dem Signal-Zeit-Verlauf ein Kontrastmittel-Zeit-Verlauf zugeordnet (Abb. 43).

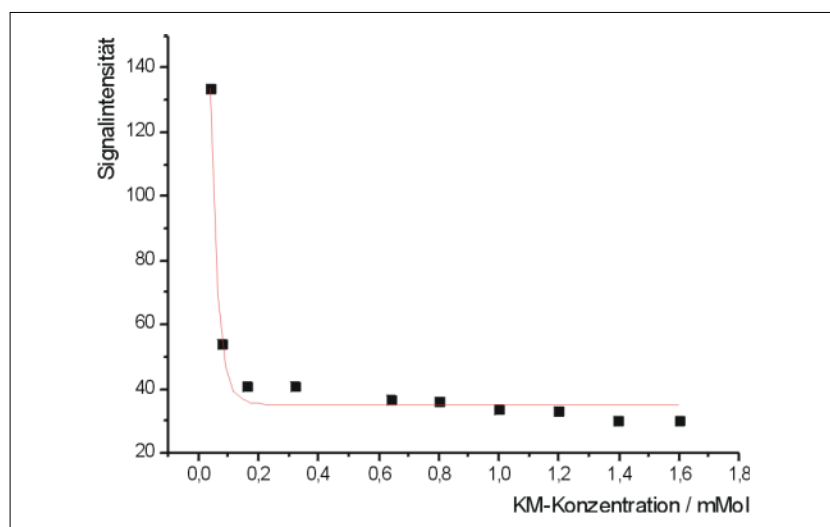


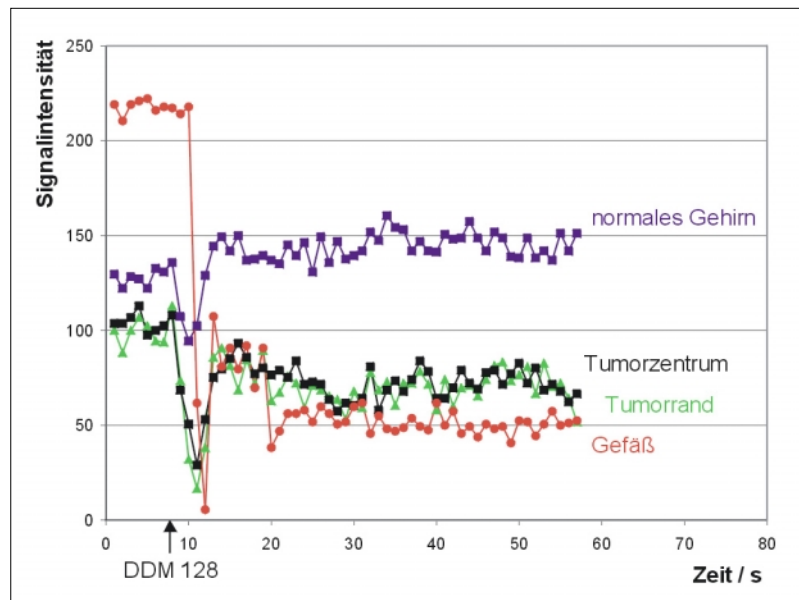
Abb. 43.: Durchflussphantommessungen mit DDM 128

Gemessene und „angepasste“ Signalkurve in Abhängigkeit von der KM-Konzentration anhand eines dynamischen Durchflussphantoms nach Gabe von DDM 128.

DDM 128-Gabe mit anschließender dynamischer MR-Bildgebung führte auch in vivo zu einem starken Signalabfall innerhalb der Tumoren. Abb. 44 zeigt den typischen Signal-Zeit-Verlauf nach Gabe von DDM 128.

Abb. 44.: Signalzeitverlauf nach DDM 128-Injektion

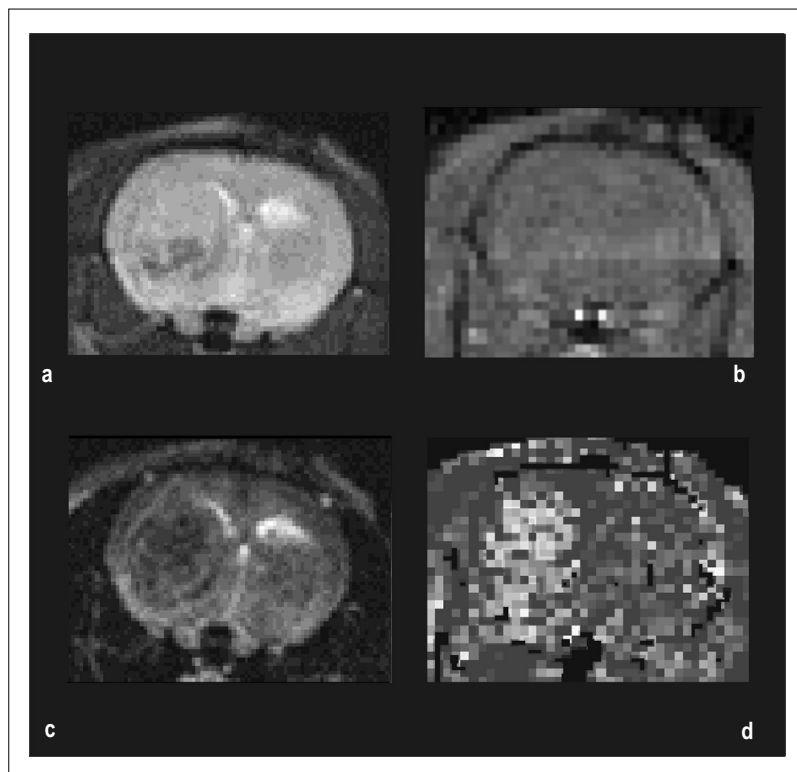
Nach Bolusgabe von DDM 128 kommt es im Tumor zu einem starken Signalabfall ohne messbare Extravasation in das umgebende Hirnparenchym.



Aufgrund der hohen Molekülgröße dieser Verbindung kam es während des Untersuchungszeitraumes zu keiner messbaren Extravasation in das umgebende Zellinterstitium. Eine berechnete Kartierung von CBV ist in Abb. 45 gezeigt. Die Permeabilität ließ sich aus genannten Gründen nicht berechnen.

Abb. 45.: CBV-Mapping beim 9L-Gliom mit DDM 128

T2w-Sequenz. Nach früherer DDM-128-Gabe sind noch KM-Reste im Tumorgewebe (a). T2*w-Sequenz vor DDM 128-Injektion (b). Nach erneuter DDM 128-Injektion starker Signalabfall innerhalb der Tumorregion (c). Mathematisch berechnete CBV-Kartierung (d).



8. 3. 2. Histologie

Die kernspintomographischen Ergebnisse zur Gefäßpermeabilität ließen sich histologisch über die Verteilung von Evans-Blue und Immunglobulinen bestätigen. Dabei zeigt sich eine klare Zeitabhängigkeit der Tumorgefäßpermeabilität von der Größe der Tumoren: während die Permeabilität bei kleinen Tumoren gering ist, steigt sie deutlich mit zunehmender Größe (Abb. 46).

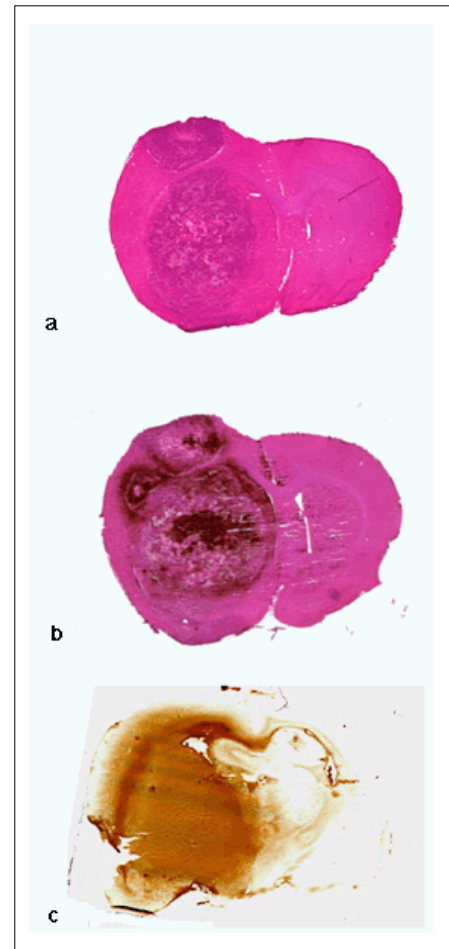


Abb. 46.: IgG-Immunhistochemie bei einem C6-Tumor

HE-Färbung (a). DAB-verstärkte Eisenfärbung (b). IgG-Immunhistochemie (c). Die BHTS ist für IgG permeabel, IgG diffundiert über die Schranke in das umgebende Hirnparenchym. Die gestörte BHTS reicht über den eigentlichen Tumor hinaus und breitet sich über den Balken aus

Die Tumorgefäße waren für das kleiner molekulare IgG deutlich permeabel, das großmolekulare IgM zeigte sich nur sehr reduziert im extravaskulären Raum. Die Verteilung der Immunglobuline korrelierte weitgehend mit den T2 Bildern und ging weit über das eigentliche Tumorareal hinaus. 9L-Tumoren zeigten im Vergleich zu C6-Tumoren eine etwas höhere Tumorneovaskularisation. Die Tumorgefäße waren häufig besonders in der Tumorperipherie vermehrt und versorgten dort den Tumor fächerförmig. Andere Tumore wiesen eine eher homogene Verteilung der Gefäße auf. Dabei waren bei den Tieren, welche Eisenoxide erhalten hatten und nicht mit Formalin perfundiert worden waren, die Tumorgefäße noch mit dem injizierten MION gefüllt und ließen sich histologisch so gut darstellen (Abb. 47).

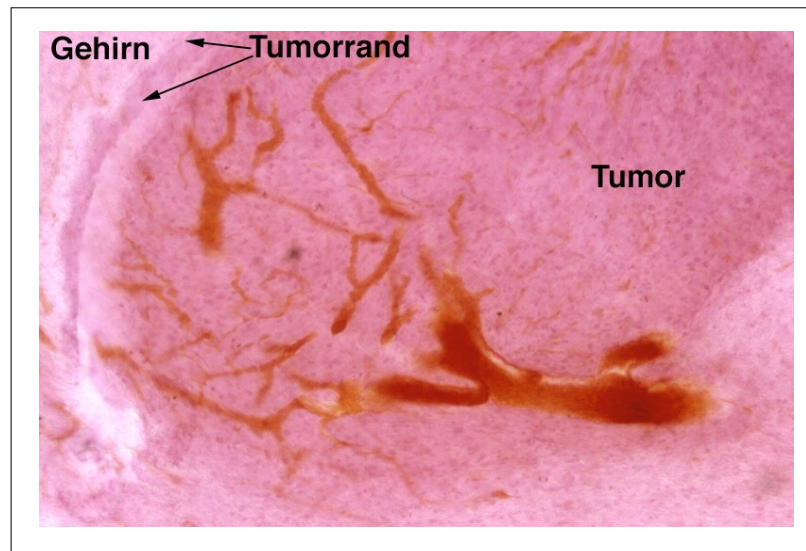


Abb. 47.: Vaskularisation des 9L-Glioms

Vibratonschnitt durch einen Tumor nach Eisenoxidgabe. Die Tumorgefäße waren noch mit Eisenoxiden angefüllt und ließen sich mit Eisenfärbungen braun anfärben. Der Tumor ist in der Peripherie fächerförmig stark vaskularisiert. DAB-verstärkte Eisenfärbung und HE-Gegenfärbung.

Die größten Eisenablagerungen im interstitiellen Tumorgewebe korrelierten eindeutig mit Arealen hoher Neovaskularisation. Quantitativ waren die Tumorgefäße deutlich dichter gepackt als die Gefäße des normalen Gehirns. Die Tumurvaskularisation war gegenüber dem normalen Hirnparenchym der Ratte (weiße Substanz) um das 3-4 fache erhöht.

Bei einem exemplarisch ausgewerteten Tier ergab sich eine gute Korrelation zwischen dem histologisch und kernspintomographisch ermittelten CBV, allerdings lagen die histologischen Werte etwas unter den radiologisch gemessenen. (Tab 2).

Ort:	Tu - Zentrum	Tu - Peripherie	Normales Gehirn
MRT	15 ± 5%	14 ± 5%	5 ± 5%
Histologie	11 ± 1%	10 ± 1%	3 ± 1%

Tab. 2.: Korrelation des histologisch und MR-tomografisch bestimmten CBV bei einem 9L-Gliom

Das Kaliber der Tumorgefäße variierte z. T. sehr stark innerhalb derselben Tumorschnittebene; so zeigten sich an einem Ort normalkalibrige Tumorgefäße, während in der benachbarten Region in einem größeren Areal die Gefäße eher "dilatiert" wirkten (Abb. 48). Bei den angewandten Tumorzelllinien infiltrierten die Tumorzellen häufig entlang von Blutgefäßen in das gesunde Gewebe (s. a. Abb. 20).

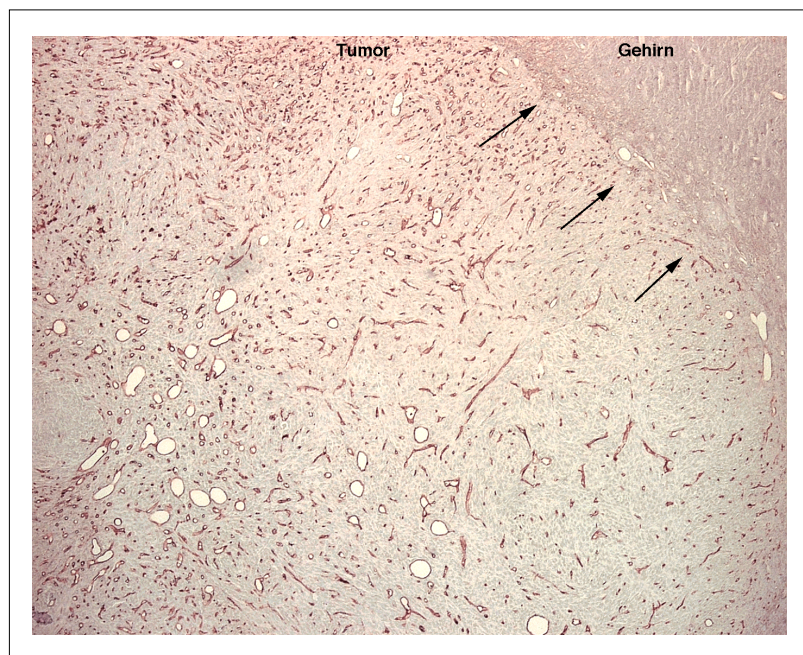


Abb. 48.: Vaskularisation des 9L-Glioms

Isolektin B4-Histochemie an einem 9L-Tumor. Deutlich erhöhte Vaskularisation des Tumors gegenüber dem angrenzenden Hirnparenchym (Pfeile). Sehr heterogene Vaskularisation des Tumors: innerhalb einer Schnittebene fanden sich einerseits Regionen mit stark dilatierten Gefäßen (Tumorregion links unten), andererseits Regionen mit eher kontrahierten Gefäßen (Tumorregion rechts oben). Dieses Muster war durch den gesamten Tumor hindurch zu verfolgen. Vergrößerung X 100

8. 4. Diskussion

Gliome zählen zu den mit am stärksten vaskularisierten Tumoren überhaupt. Schon 1971 hat Folkman die Hypothese aufgestellt, dass Tumore für das Wachstum über eine bestimmte Größe hinaus von mikrovaskulärer Proliferation abhängig sind und deshalb eine auf Hemmung der Angiogenese ausgelegte Therapie antineoplastische Wirkung hat (287). Heutzutage werden die ersten antiangiogenetischen Wirkstoffe klinisch getestet (288). Die Bedeutung der Vaskularisation von Gliomen findet auch darin ihren Ausdruck, dass es heutzutage zumindest Strömungen innerhalb der Neuropathologie gibt, die für das histologische Grading ein zweistufiges Klassifizierungssystem vorschlagen, welches ausschließlich die Tumorangiogenese als Klassifizierungskriterium berücksichtigt und das die mikrovaskuläre Proliferation als entscheidendes Kriterium zur Gradfestlegung zugrunde legt. (289). In einer solchen Klassifizierung wird lediglich noch zwischen niedrig-gradigen Gliomen (entsprechend WHO Grad I - II) mit fehlender vaskulärer Proliferation und hoch-gradigen Gliomen (entsprechend WHO Grad III - IV) mit vorhandenen Gefäßproliferationen unterschieden.

Für die radiologische Diagnostik von Gliomen ist die Vaskularisation insbesondere von großer Bedeutung, da sich mit neueren MR-Methoden die Mikrozirkulation des Tumors (u.a. der regionale Blutfluss, das regionale Blutvolumen und die Kapillarpermeabilität) spezifisch analysieren und damit auch wesentliche prognostische und differentialdiagnostische Informationen erheben lassen.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Methoden beschrieben, in denen bestimmte Parameter der Mikrozirkulation innerhalb von Tumoren kernspintomographisch analysiert wurden (290, 81, 83, 84). Diese Methoden beschreiben meist die Kinetik von niedrig molekularen KM, wobei häufig ultraschnelle MR-Bildgebung angewandt und der Methodik theoretische Kompartiment-Modelle zugrunde gelegt wurden. Diese Methoden ermöglichen auch, Vaskularisationsparameter zu quantifizieren. Die Anwendung dieser Methoden ist allerdings bei malignen Gliomen problematisch und unzuverlässig, da maligne Gliome mit zunehmender Enddifferenzierung eine erhöhte Permeabilität für die angewandten MR-Tracer (meist Gd-DTPA) entwickeln. Bei diesen Tumoren ist bereits die erste frühe Passage des KM durch den Tumor eine Mischung aus noch vaskulärem und be-

reits extravaskulärem KM, was die genaue Analyse des rein vaskulären Kompartiments verhindert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde zur MR-Analyse des vaskulären und des interstitiellen Volumens experimenteller Gliome eine Methode angewandt, die darauf basiert, dass großmolekulare, sog. „Blut-Pool-Marker“ in Kombination mit kleinmolekularen MR-Markern zum Einsatz kommen und durch einfache Subtraktion der gewonnenen Aufnahmen vor und nach Gabe der entsprechenden KM entweder das vaskuläre Kompartiment oder das interstitielle Kompartiment des Tumors dargestellt wird. Die Ergebnisse zeigten, dass sich auf diese einfache Weise über eine Auswertung der zeitabhängigen Signalanreicherungskurven das vaskuläre eindeutig von dem extravaskulären Kompartiment trennen lässt. Dies ließ sich auch von anderen Autoren bestätigen (291). Dabei kennzeichnet die Subtraktion des Grundsignals von den Signalveränderungen nach Injektion des makromolekularen Markers das *vaskuläre Volumen*, während die Subtraktion der Signalveränderungen nach Gabe des makromolekularen Markers von dem Signal nach Gabe beider Marker (makromolekularer Marker und kleinmolekularer Marker) in der Darstellung des *interstitiellen Volumens* mündet. Das dargestellte interstitielle Volumen ist natürlich von der Permeabilität der Tumorgefäße und von der KM-Größe abhängig. Eine Pixel für Pixel-Analyse der entsprechenden zeitabhängigen Signalanreicherungskurven erlaubt neben den einfachen Subtraktionsbildern die Erstellung von entsprechenden „Maps“, die von jedem Ort des Tumors Aussagen über die Vaskularisation bzw. das interstitielle Volumen erlauben. Die angewandte Methode der kombinatorischen Anwendung von groß- und kleinmolekularen KM-Markern erbrachte keinen wesentlichen Unterschied bei der Anwendung von zwei verschiedenen Blut-Pool-Markern (MPEG-PI-Gd-DTPA und Gadomer 17). Obwohl Gadomer 17 wesentlich kleinmolekularer (35 kD) als das Polymer MPEG-PI-Gd-DTPA (560 kD) ist, passiert es auf Grund der ausreichenden Größe nicht unmittelbar die BHTS, um in das Interstitium zu diffundieren.

Die beschriebene Methode stellt eine einfach durchzuführende Möglichkeit zur Analyse der Tumervaskularisation dar, die nicht auf ultraschnelle Bildgebung angewiesen ist, keine großen Rechenoperationen erfordert und der keine komplizierten - zumeist hypothetischen - Kompartimentmodelle zugrunde liegen. In einer Studie an humanen Gliomen ließ sich, allerdings an einem etwas anderen Modell, zeigen, dass einfache Subtraktions-Maps gut mit mathematisch

berechneten rCBV-Maps korrelierten (292). Dennoch ist die Aussagekraft von solchen Subtraktionsbildern auch begrenzt. So ist es nicht möglich, die Tumervaskularisation direkt zu quantifizieren, es lassen sich nur relative Werte erzielen, die zur Umgebung in Bezug gesetzt werden können. Ein weiterer Nachteil der beschriebenen Methode ist, dass sie die Kenntnis der im Blut ankommenden Gd-Konzentration erfordert, um nicht durch eine Überdosierung der KM-Menge einen Signalabfall zu erzielen (T2-Effekt). Ein Problem in den vorliegenden Untersuchungen ist auch die insgesamt geringe Größe der untersuchten Tumoren mit der damit reduzierten Auflösung, was aber ein eher grundsätzlicher Nachteil solcher tierexperimentellen Untersuchungen ist und seine Änderung in der Anwendung bei größeren Tumoren am Patienten erfährt.

Ganz grundsätzlich bietet die Anwendung von makromolekularen KM zur Analyse der Vaskularisation von Tumoren eine Reihe von Vorteilen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Untersuchungen vornehmlich auf dem Gebiet der experimentellen MR-Forschung mit solchen Markern durchgeführt (293, 294). Außerhalb des Gehirns sind diese Verbindungen für die MRT u.a. von Interesse, da sie im normalen Gewebe nicht den Gefäßraum verlassen, was große Vorteile für MR-angiographische, aber auch dynamische Perfusionsuntersuchungen bringen kann. Bei Tumoren, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Gehirns, verlassen auch diese großmolekularen Marker die Tumorgefäße und diffundieren in das Interstitium (295). Da dies aber, verglichen mit kleinmolekularen Markern, wesentlich langsamer geschieht, ermöglichen diese Tracer eine Quantifizierung der Permeabilität. Kleinmolekulare Marker verlassen bei gestörter BHS/BTS viel zu schnell den Gefäßraum, als dass die Permeabilität der Gefäße auch bei der Wahl von sehr schnellen Sequenzen zeitaufgelöst quantifiziert und die einzelnen Kompartimente voneinander getrennt werden können (296). Genaue, auch quantitative Informationen über die Permeabilität der Tumorgefäße von Gliomen zu haben, ist insofern wichtig, da Veränderungen der Permeabilität mit dem Grad der Malignität bei vielen Tumoren, und auch bei Gliomen, korrelieren (297).

Auch Eisenoxide können, zumindest eingeschränkt, insofern als Blut-Pool-Marker aufgefasst werden, da sie z.B. gegenüber Gd-DTPA eine deutlich verlängerte Bluthalbwertszeit aufweisen. Für Perfusionsmessungen haben solche superparamagnetischen Verbindungen gegenüber den paramagnetischen Chelaten (z. B. Gd-DTPA) den Vorteil, dass der Suszeptibilitätseffekt dieser Verbindungen deutlich höher ist und dadurch wesentlich kleinere Injektionsvolumina notwendig

sind (298). Diese starke Wirkung auf die Suszeptibilität und die dadurch hervorgerufenen Artefakte führen auf der anderen Seite zu dem Nachteil, dass quantitative Messungen, obwohl beschrieben (299), mit diesen Verbindungen nur eingeschränkt verwertbar sind. Nachteilig in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass diese Verbindungen keine eindeutig definierbare Molekülgröße besitzen, sondern sich diese nur in einer Gauß-Verteilung beschreiben lässt. Dies führt dazu, dass mit solchen Markern daher kaum zuverlässige Aussagen zur Permeabilität von Gefäßen möglich sind.

Interessant ist die Beobachtung, dass lange in den Gefäßen zirkulierende MR-Marker direkt von den Endothelzellen der Tumorgefäße intrazellulär aufgenommen werden. Dies impliziert die Frage, inwieweit nicht die pharmakologische Bindung von therapeutischen wirksamen Substanzen, welche Einfluss auf die Endothelzellproliferation haben, an solche Blut-Pool-Marker deren Wirksamkeit erhöht. Zusätzlich hätte man den Effekt, den Therapieerfolg mittels MRT monitoren zu können..

Gegenüber konventioneller, anatomisch-morphologisch orientierter MR-Bildgebung bringen funktionelle dynamische MR-Techniken, die die Mikrozirkulation von Gliomen erfassen, wesentliche Zusatzinformationen, wobei sich mit solchen Methoden prognostisch und differentialdiagnostisch relevante Informationen nicht-invasiv in vivo erheben lassen. So ließ sich zeigen, dass rCBV-Messungen mit dem Grading von Gliomen korrelieren (85, 86). Auch in der Artdiagnose von Hirntumoren helfen solche Messungen weiter, da zwischen Tumoren differenziert werden kann, die ein KM-Enhancement auf Grund von erhöhter Vaskularisation zeigen (z. B. Glioblastom) und Tumoren, bei denen die Gefäßdichte noch normal ist, aber die Gefäßpermeabilität deutlich erhöht ist (z. B. Lymphome). Von klinischer Relevanz sind solche MR-Analysen der Tumormikrozirkulation aber auch, da der Therapieerfolg bei verschiedenen Therapiestrategien, die mittelbar oder unmittelbar auf die Tumervaskularisation Einfluss haben kontrolliert und auch quantifiziert werden kann. So ließen sich bestrahlungsinduzierte Blutvolumenänderungen bei Gliompatienten sowohl im Tumor selbst als auch im normalen Hirngewebe mit dynamischer T2*-gewichteter MR-Bildgebung messen (300). Aber auch für andere bereits angewandte (Thermotherapie, Chemotherapie, Embolisation) oder für die in Zukunft erfolversprechenden Therapieformen bei Gliomen (z.B.

antiangiogenetische Therapie, Gentherapie), die die Tumorangio-genese beeinflussen, bietet die dynamische MRT eine Möglichkeit des Therapiemonitorings (301, 302, 303, 304).

Es ist darauf hinzuweisen, dass CBV zwar als das innerhalb eines Voxels von Blut durchströmte Gefäßvolumen definiert ist, dass dies jedoch nicht mit der Gefäßdichte innerhalb des Tumors gleichzusetzen ist. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung bei der histologischen Auswertung der Tumervaskularisation, dass die Durchmesser der Tumorgefäße innerhalb derselben Schnittebene bei den experimentellen Gliomen z. T. sehr heterogen sind. Das bedeutet, dass in den Tumorarealen mit dilatierten Tumorgefäßen gegenüber den Arealen mit normalkalibrigen Gefäßen das Blutvolumen bei gleicher Gefäßdichte erhöht sein kann. Die Ursache für den unterschiedlichen Dilatationsgrad der Gefäße innerhalb von Tumoren und auch der Einfluss auf das kernspintomographisch zu messende Blutvolumen ist bislang nicht systematisch erforscht. Neben methodischen Gründen, die auf der unterschiedlichen ex vivo/in vivo Situation beruhen (Blutdruck, histologische Gewebeaufarbeitung u. a.) dürften dem aber auch andere Ursachen, wie z. B. unterschiedliche interstitielle Druckverhältnisse innerhalb des Tumors, zu Grunde liegen.

Neben der quantitativen Erfassung des Blutvolumens des Tumors wird bei einigen Therapien (z.B. Radiatio) auch die genaue Quantifizierung der Permeabilität der Tumorgefäße eine wichtige Rolle im Therapiemonitoring spielen, wobei z.B. bei der Bestrahlung von Tumoren eine Steigerung der Permeabilität der Tumorgefäße als Therapieerfolg gewertet werden kann. Problematisch kann dies allerdings bei Gliomen werden, da andererseits eine erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße auch als Zeichen der Tumorenddifferenzierung interpretiert werden kann.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Für die Diagnostik von Gliomen brachte die Einführung der Magnetresonanztomographie auf Grund des hohen Weichteilkontrastes einen deutlichen Fortschritt. Einige Punkte sind jedoch mit der *konventionellen MRT* nicht zufriedenstellend gelöst. So kann u.a. die Tumorgrenze nicht exakt definiert werden, ein in vivo Tumorgading und auch das Monitoring von Therapien ist nicht sicher möglich, darüber hinaus lassen sich kaum relevante Informationen zur Tumorbilogie erhalten. Eine deutliche Weiterentwicklung, auch auf dem Gebiet der Gliombildgebung, stellen neuere MR-Techniken dar: *funktionelle MRT (fMRT)* ermöglicht die Visualisierung von funktionell aktiven Hirnarealen in Abgrenzung zum Gliom. Nachteil der Methode ist u.a., dass sich damit derzeit noch nicht alle relevanten Hirnareale aktiviert erfassen lassen und dass bei malignen Gliomen Interferenzen zwischen Tumor- und Aktivierungs-bedingter Mehrdurchblutung die wahre Ausdehnung des funktionellen Hirnareals beeinträchtigen können. *Dynamische, Perfusions-gewichtete MRT (dMRT)* erlaubt die Visualisierung und auch Quantifizierung einer Reihe von wichtigen Parametern der Gliomvaskularisation (rCBV, rCBF, rP), wobei die meist gestörte Blut-Hirn-Schranke/Blut-Hirn-Tumor-Schranke (BHS/BHTS) bei malignen Gliomen nach wie vor ein Problem bei der Analyse dieser Parameter darstellt. Inwieweit *Diffusions-gewichtete MRT (DWI)* bei Hirntumoren – im Gegensatz zu ihrer gesicherten Bedeutung in der Ischämie-Diagnostik – wesentliche Mehrinformationen zu Gliomen liefert, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch offen. Auch die *Magnetresonanzspektroskopie (MRS)* erlangt zunehmende praktische Bedeutung, dabei bietet die derzeit hauptsächlich noch angewandte „Single-Voxel-Technik“ den Nachteil, dass die Heterogenität der Gliome nicht zufriedenstellend berücksichtigt wird. Auch andere bildgebende Verfahren wie *nuklearmedizinische Methoden* (PET und SPECT), aber auch die *Xenon-CT (Xe-CT)* bieten im Vergleich zur MRT zwar Mehrinformationen in funktioneller Hinsicht, sie haben jedoch Defizite insbesondere in der Ortsauflösung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Strategien zu entwickeln, die zu einer Verbesserung der MR-Diagnostik von Gliomen führen. Im Vordergrund des Interesses stand dabei die MR-Charakterisierung von experimentellen Gliomen mittels superparamagnetischer Eisenoxide.

MION (“Monocrystalline-Iron-Oxide-Nanopartikel”) wurde als Modellsubstanz für einen Großteil

der Untersuchungen benutzt. Diese Verbindung hat eine hohe magnetische Potenz und ist daher bereits in sehr niedrigen Konzentrationen kernspintomographisch im Gewebe nachweisbar, sie lässt sich chemisch leicht an ihrer Oberfläche zur Rezeptor- oder Antigen-spezifischen Bindung modifizieren und kann histologisch und in vitro problemlos zu den MR-Untersuchungen korreliert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien basieren auf den kernspintomographischen und histologischen Untersuchungen von 136 Ratten mit implantierten Gliomen als auch auf Zellkulturuntersuchungen mit mehreren Gliom- und Karzinom-Zelllinien.

Zunächst wurde ein *Tier-Gliom-Modell* etabliert, welches a) die Erprobung neuerer MR-Techniken und noch nicht klinisch zugelassener MR-Marker ermöglicht, und welches b) die meist komplexen Signalveränderungen bei Gliomen histologisch erklären lässt. Durch den Einsatz von transfizierten Zelllinien ließen sich die Untersuchungsergebnisse auf eine sichere histologische Basis stellen, die damit erreichte kontrastreiche histologische Darstellung von singulären Tumorzellen erlaubte eine einfache Korrelation zu den entsprechenden MR-Befunden. Obwohl beide eingesetzten Gliom-Zelllinien (C6, 9L) den menschlichen Gliomen in zahlreichen Eigenschaften ähneln, unterscheiden sie sich makroskopisch durch eine eher scharfe Abgrenzbarkeit zum umgebenden Hirngewebe, wie sie sonst eher von Hirnmetastasen bekannt ist. Histologisch allerdings infiltrieren auch diese Zelllinien partiell das umliegende Gehirn, wobei - ähnlich dem menschlichen Gliom - auch Tumorzellen in der kontralateralen, primär nicht betroffenen Hirnhemisphäre gefunden werden. Um die dünneren (im Mikrometerbereich) histologischen Schnitte mit den dickeren MR-Schnitten (0,7 bzw. 3 mm) vergleichen zu können, wurde eine spezielle Methodik entwickelt, mit der sich die Histologie mit den MR-Bildern in Schnittdicke und Lokalisation gut korrelieren ließ. Diese Technik beruht darauf, dass mehrere histologische, gefärbte 5µm dicke Schnitte digital zu einem virtuellen Schnitt zusammengesetzt werden, der mit der Dicke des jeweiligen MR-Schnittes korreliert.

In Experimenten zur *BHS* sollte untersucht werden, inwieweit eine primär intakte BHS durch pharmakologische Manipulation für MR-Marker passierbar gemacht werden kann. Normales Hirngewebe jenseits der BHS wird mit Eisenoxiden dann erreicht, wenn artifiziell die BHS zuvor hyperosmotisch

durch Mannitol-Infusion temporär geöffnet wurde. Neben der intrazellulären Aufnahme in Astrozyten werden Eisenoxide nach erfolgter BHS-Öffnung in signifikant höherem Maße von aktivierter Mikroglia phagozytiert. Die KM-Verteilung innerhalb des Hirngewebes nach erfolgter Schrankenöffnung korreliert mit dem zerebralen Blutfluss, der stärker vaskularisierte Kortex zeigt höhere Eisenoxidablagerungen als das minder perfundierte zentrale Marklager. Trotz direkter Eisenoxidinjektion in die A. carotis interna kommt es allerdings nur zu einer Kontrastmittelablagerung von 0.2% der injizierten Dosis. Eisen-sensitive Gradienten-Echo (GE)-Sequenzen sind jedoch geeignet, bereits sehr niedrige Eisenkonzentrationen im Gewebe kernspintomographisch nachzuweisen (Nachweisbarkeitsgrenze 62 ng Fe/mm^3 , entsprechend ca. 450000 Partikel/g Gewebe). Während sich Eisenoxide in T2-gewichteten Spin-Echo (SE)-Sequenzen immer signalarm darstellen, ist die Signalgebung in T1-gewichteten Sequenzen biphasisch abhängig von der Eisenkonzentration im Gewebe: Konzentrationen kleiner als $10\mu\text{g Fe/mm}^2$ zeigen sich als signalintens, während höhere Konzentrationen zur Signalminderung führen.

Nach selektiver Öffnung der *BHTS* durch Bradykinin-Injektion in die A. carotis interna lässt sich selektiv der Transport von Eisenoxiden in das Gliomzentrum vergrößern, auf die Tumorperipherie und das normale Hirnparenchym erzielt Bradykinin keine Wirkung.

An dem *experimentellen Gliommodell* ließ sich zeigen, dass intravenöse MION-Gabe (10 mg Fe/kg) zu einem charakteristischen ringförmigen Erscheinungsbild der großen Tumoren führt: in T2-gewichteten SE und GE Sequenzen stellen sich zellarme Tumorbezirke (histologisch: niedrige Eisenkonzentration) im Zentrum (Nekrose) und in der Peripherie (Infiltrationszone) signalintens dar, das zellreiche Tumorgewebe (histologisch: ausgeprägte Eisenoxid-Phagozytose) bildet dazwischen einen deutlichen, breiten signalarmen Ring. In T1-gewichteten Sequenzen ist der mittlere Ring weniger hypointens und wesentlich schmaler. Bei sehr kleinen Tumoren lassen sich diese ringförmigen Signalveränderungen nicht finden. 9L-Tumoren hatten selten eine zentrale Nekrose, auch wenn sie sehr groß waren; dementsprechend fehlte häufig der signalintense (T2) Bezirk im Zentrum dieser Tumoren. Im zeitlichen Verlauf waren die Signalveränderungen am stärksten ausgeprägt zwischen 12 und 24 hrs nach MION-Injektion, nach 3 ds war noch ein schwaches Signal zu erkennen, während dieses nach 5 ds vollkommen verschwunden war. Die zur Signalerzeugung

notwendige Schwellendosis lag bei 4 mg Fe/kg MION, während 2 mg Fe/kg MION (klinisch z. Zt. zugelassene Dosis für kommerziell erhältliche Eisenoxidpräparationen) zu keiner nennenswerten Signaländerung führten. Entgegen dem Dogma, wonach Eisenoxide nur von Zellen des RES intrazellulär aufgenommen werden, zeigten die histologischen Untersuchungen bei beiden Gliomarten (C6 und 9L) eindeutig die Phagozytose von Eisenpartikeln durch Gliomzellen. Die Menge an abgelagertem Eisen innerhalb der Tumoren korrelierte klar mit der injizierten MION-Dosis, für die intrazelluläre Aufnahme in die Gliomzelle werden allerdings hohe lokale MION-Dosen benötigt (mindestens 10 mg Fe/kg MION). Verglichen mit der Eisenoxid-Aufnahme in die Gliomzelle ist die Phagozytose der Eisenpartikel durch ortsständige Mikrogliazellen und Blutmakrophagen jedoch signifikant größer. Mikroglia und Blutmakrophagen durchsetzen in dem angewandten Gliommodell in hohem Maße die Tumoren und führen zu einer Demarkation der Tumoren in der Tumorumgebung. Beide Zelltypen lassen sich *in vitro* und im Tumormodell *in vivo* durch Eisenoxide „magnetisch labeln“.

In *Zellkulturexperimenten* wurde untersucht, wieweit MION von verschiedenen Gliom- (C6, 9L) und Karzinom-Zelllinien (LX-1) phagozytiert wird und ob es quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien hinsichtlich der Phagozytosepotenz gibt. Von allen drei Zelllinien wird MION in großen Mengen *in vitro* intrazellulär aufgenommen. Die intrazelluläre Lokalisation ändert sich im Zeitverlauf, wobei MION zunächst in tubulären und später in vesikulären, perinukleären Strukturen lokalisiert ist. Dies legt einen intrazellulären Abbau von MION über tubuläre bzw. terminale Lysosomen nahe, bevor MION dann in den körpereigenen Eisenpool eingeschleust wird. Innerhalb der Lysosomen war MION bis zu 14 ds nach Inkubationsbeginn zu verfolgen. MION wird *in vitro* in Konzentrationen bis zu 10 ng Fe/10⁶ Zellen intrazellulär aufgenommen, was hochgerechnet ungefähr 50.000 Partikel pro Zelle bedeutet. Verglichen mit C6 und 9L ist die Aufnahme durch die Karzinom-Zelllinie signifikant größer. Die Aufnahme von MION in die Tumorzellen erfolgt bereits in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich von kleiner 10 M, was gegen einen pinozytotisch vermittelten Aufnahmemechanismus spricht.

Es wurde speziell der Frage nachgegangen, inwieweit die direkte Tumorzellmarkierung durch Eisenoxide zu einer genaueren Darstellung der Tumordinfiltrationszone bei Gliomen führt. Dazu

wurde hochauflöste *MR-Mikroskopie* angewandt. Um die gesamte Tumorausdehnung eindeutig histologisch erfassen zu können, wurden transfizierte 9L-Gliomzellen (9L-TK) benutzt. Durch die Untersuchung in einem 9,4 T Magneten konnte eine nahezu mikroskopische Auflösung (isotrope Voxel-Größe 86 μm) erzielt werden. Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen MION-verstärkter MR-Bildgebung und histologisch bestimmter Tumorausdehnung (Differenz nicht signifikant, $p=0.331$). Die MR-Bildgebung zeigte meist eine scharfe Demarkation der Gliome, wobei sich ein eisenbedingter Signalverlust bevorzugt im Tumorrand feststellen ließ. Histologisch fanden sich hier die größten Eisenmengen. Obwohl die Tumoren in der Regel zum umgebenden Hirngewebe metastasenartig scharf demarkiert sind, zeigen sich histologisch immer wieder unscharf abgegrenzte Areale, in denen die Tumorzellen infiltrativ in das gesunde Gewebe migrieren. Diese verstreuten Tumorzellen zeigten häufig eine deutliche Eisenphagozytose, auch dann, wenn sie weit von der eigentlichen Tumormasse entfernt waren. Allerdings war auch ein Großteil dieser vom eigentlichen Tumor entfernt liegenden neoplastischen Glia nicht für Eisen färbbar, außerdem fand sich immer wieder freies, im Zellinterstitium liegendes Eisen. Dabei sind die beobachteten markanten Signalveränderungen im Tumorrandbereich auf eine Kombination aus intravaskulärem und intrazellulärem, aber auch auf extrazelluläres interstitielles Eisenoxid zurückzuführen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass hochauflösende MR-Mikroskopie in Kombination mit einer langzirkulierenden Eisenoxidpräparation zwar einen Ansatz bietet, die Tumorausdehnung zu visualisieren. Insbesondere jedoch der extrazelluläre Eisenoxidanteil kann die wahre Tumorgöße überbetonen, andererseits lassen sich auch nicht alle infiltrierenden Zellen auf Grund der noch intakten BHS magnetisch markieren.

In vitro und im experimentellen Gliommodell wurde untersucht, inwieweit die Konjugation von *Transferrin* (*Tf*) an eine Eisenoxidverbindung (USPIO) die Tumorspezifität dieses Kontrastmittels für Gliomzellen erhöht. Ferner wurde der Frage nachgegangen, ob eine solche Konjugation Möglichkeiten schafft, Kontrastmittel über eine zunächst intakte Blut-Hirn-Schranke in das Hirnparenchym und in die Tumorzelle zu schleusen. Transferrinrezeptoren auf Tumorzellen und ein Transferrin-Rezeptor vermittelter Shuttle über die BHS ist auch für größere Moleküle beschrieben. Histologische Untersuchungen an einem β -Galaktosidase transfizierten C6-Gliom zeigen, dass diese Tumore bevorzugt entlang von Gefäßen das benachbarte Gehirn infiltrieren. Gefäßendothelien

als auch die Gliomzellen selbst zeigten histologisch eine starke Expression von Transferrin-Rezeptoren. Tf-USPIO werden in großen Mengen sowohl von den Gefäßendothelien als auch von den perivaskulären Tumormanschetten intrazellulär aufgenommen. Quantitative Untersuchungen in vitro an jeweils einer C6- und 9L-Zelllinie ergaben für Tf-USPIO eine 3.3- bzw. 6.9-fach erhöhte intrazelluläre Aufnahme verglichen mit unkonjugiertem USPIO. In vivo gelang ein Transport von Tf-USPIO über eine intakte BHS jedoch nicht.

Ferner wurde die *Tumervaskularisation* von experimentellen Gliomen näher untersucht mit der Frage, inwieweit sich die Gliomangiogenese spezifischer als mit konventioneller MRT unter Einsatz von sog. „Blut-Pool-Markern“ oder durch Kombination dieser mit kleinmolekularen KM (Gd-DTPA) visualisieren lässt. Neben Eisenoxiden, die ebenfalls Eigenschaften von Blut-Pool-Markern haben, wurden zwei weitere lang zirkulierende KM (MPEG-PI-Gd-DTPA und Gadomer 17) angewandt. Verschiedene Vaskularisationsparameter wurden entweder durch kombinatorische Anwendung von zwei unterschiedlich großen KM durch einfache Bildsubtraktion ermittelt oder nach alleiniger Gabe der Blut-Pool-KM mathematisch berechnet und in Vaskularisationskartierungen (Maps) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die kombinatorische Anwendung eines kleinmolekularen und eines großmolekularen Markers mit anschließender einfacher Bildsubtraktion die vaskulären und interstitiellen Volumenfraktionen (VVF, IVF) ermittelt werden können. Dabei ließen sich die kernspintomographischen Ergebnisse zur Gefäßpermeabilität histologisch über die Verteilung von Evans-Blue und Immunglobulinen korrelieren. Es zeigte sich dabei eine klare Zeitabhängigkeit der Tumorgefäßpermeabilität von der Größe der Tumoren: Während die Permeabilität bei kleinen Tumoren gering ist, steigt sie deutlich mit zunehmender Tumorgroße. Die angewandte MR-Methode ist qualitativ, quantitative Daten können dadurch nicht erhoben werden. Demgegenüber ermöglicht die alleinige Gabe der beiden Blut-Pool-Marker MPEG-PI-Gd-DTPA und Gadomer-17 mit anschließender mathematischer Berechnung die quantitative Bestimmung sowohl des vaskulären Volumens (CBV) als auch der Permeabilität (P). Gd-DTPA und Eisenoxide sind hierfür nicht geeignet. Das kleinmolekulare Gd-DTPA ist für die Bestimmung dieser Parameter bei Gliomen dann unzuverlässig, wenn die BHS bzw. BHTS durch den Tumor beeinträchtigt ist. Bei den Eisenoxiden verfälschen deren starke Suszeptibilitätseffekte die quantitative Bestimmung von CBV, auch die Quantifizierung der Gefäßpermeabilität ist mit diesen Verbindungen mittels

dynamischer MRT nicht möglich.

Schlussfolgernd zeigen die Untersuchungen, dass die intravenöse Eisenoxidgabe zu spezifischen MR-Signalveränderungen bei Gliomen führt, die sich von herkömmlichen Kontrastmitteln unterscheiden. Die Signalveränderungen lassen sich mit den physiochemischen und magnetischen Eigenschaften dieser Verbindungen erklären und erlauben eine Differenzierung unterschiedlicher Tumoreareale. Die Kopplung von solchen Kontrastmitteln an spezifisch bindende Moleküle (z. B. Transferrin) oder eine Manipulation der BHS vor Kontrastmittelgabe stellen eher experimentelle Strategien dar, wie sich in Zukunft die Gliombildgebung mittels MRT optimieren lässt. Mehr von praktischer Bedeutung sind die Möglichkeiten, die Tumorangiogenese, insbesondere unter Einsatz von Blut-Pool-KM, mittels dynamischer Perfusionsbildgebung spezifisch zu visualisieren. Solche Methoden können in Zukunft eine wichtige Rolle beim in vivo Grading, der Artdiagnose und der Auswahl von repräsentativen Biopsieorten für die Gewinnung von Histologiematerial, aber auch beim Monitoring neuer Therapien von Gliomen spielen.

V. LITERATUR

1. Russel, D. & Rubinstein, L. (1989) Pathology of Tumors of the Nervous System (Williams and Wilkins, Baltimore, Hongkong, London, Sydney).
2. Stat, B. (1993). Brain cancer incidence in the elderly 1973-1989. J Nat Cancer Inst 85, 181.
3. Horm, J., Asire, A., Young, J. & Pollak, E. , eds.(1984) SEER Program: Cancer incidence and mortality in the United States 1973 - 1981 (NCI, Bethesda), pp. p.53.
4. Kleihues, P., Burger, P. & Scheithauer, B. (1993) Histological typing of tumors of the central nervous system. (Springer-Verlag, Berlin).
5. Zülch, K. (1979) Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System (World Health Organization, Geneva).
6. Bailey, P. & Cushing, H. (1926) A classification of tumors of the glioma group (Lippincott, Philadelphia).
7. Kernohan, J., Mabon, R. & Svien, H. (1949). A simplified classification of gliomas. Proc Staff Meetings Mayo Clinic 24, 71-75.
8. Ringertz, N. (1950). Grading of gliomas. Acta Pathol Scand 27, 51-64.
9. Daumas, D., Scheithauer, B., O'Fallon, J. & Kelly, P. (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. Cancer 62, 2152-2165.
10. Burger, M. M. & Folkman, J. (1994). UICC Study Group on basic and clinical cancer research: tumor angiogenesis. Meeting held at Woods Hole, MA, September 18-21, 1993. Int J Cancer 56, 311-3.

11. Niedermayer, I., Kolles, H. & Feiden, W. (1998). Klassifikation und Grading von Gliomen und Meningeomen. *Radiologe* 38, 888-897.
12. Krauseneck, P., Mertens, H. G. & Messerer, D. (1989). Zwischenergebnisse der deutsch - österreichischen Studie zu den malignen supratentoriellen Gliomen des Erwachsenenalters. In *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*, eds. Fischer, P., Baas, H. & Enzensberger, P. (Springer-Verlag Berlin, Heidelberg), pp. 1090-1093.
13. Westphal, M. (1998) in *Neuroonkologie*, eds. Schlegel, U. & Westphal, M. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York), pp. 2 ff.
14. Laws, E., Goldber, W. & Bernstein, J. (1993). Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain. *Int J Dev Neurosci* 11, 691-697.
15. Giese, A., Kluwe, L., Laube, B., Meissner, H., Berens, M. & Westphal, M. (1996). Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38, 755-764.
16. Guthrie, B. & Laws, E. (1990). Supratentorial low-grade gliomas. *Neurosurg Clin N Am* 1, 37-48.
17. Liotta, L. (1986). Tumor invasion and metastasis; Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 56, 1-7.
18. Kohn, E. & Liotta, L. (1995). L651582, a novel antiproliferative and antimetastasis agent. *J Cell Biol* 127, 859-866.
19. Paulus, W., Baur, I., Huettner, C., Schmauß, B., Roggendorf, W., Schlingensiepen, K. & Brysch, W. (1995). Effect of transforming growth factor- β 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 236-244.

20. Paulus, W., Baur, I., Beutler, A. S. & Reeves, S. A. (1996). Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest* 75, 819-26.
21. Koochekpour, S., Pilkington, G. & Merzak, A. (1995). Hyaluronic acid/CD44 H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. *Int J Cancer* 63, 450-454.
22. Friedlander, D., Zagzag, D., Shiff, B., Cohen, H., Allen, J., Kelly, P. & Grumet, M. (1996). Migration of brain tumor cells on Extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alpha and β 1 integrins. *Cancer Res* 56, 1939-1947.
23. Maeda, A. & Sobel, R. (1996). Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 300-309.
24. Yoneda, T., Sasaki, A., Dunstan, C., Williams, P., Bauss, F., De Clerck, Y. & Mundy, G. (1997). Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the biphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 99, 2509-2517.
25. Kreutzberg, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318.
26. Silbergeld, D. & Ali-Osman, F. (1990). Glioblastoma-induced transformation of cultured normal endothelial cells. *J Neurosurg* 72, 343 A.
27. Plate, K. H., Breier, G. & Risau, W. (1994). Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. [Review]. *Brain Pathol* 4, 207-18.
28. Scherrer, H.-J. (1935). Gliomstudien. III. Angioplastische Gliome. *Virchows Archiv* 294, 823-

861.

29. von Deimling, A. (1998) in Neuroonkologie, eds. Schlegel, U. & Westphal, M. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York), pp. 47-56.
30. Folkman, J. (1989). What is evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 4-6.
31. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A. & Keshet, E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 768-772.
32. Van Meir, E. G., Polverini, P. J., Chazin, V. R., Su Huang, H. J., de Tribolet, N. & Caveness, W. K. (1994). Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 8, 171-6.
33. Folkman, J. (1995) in The molecular basis of cancer, eds. Mendelsohn, J., Howley, P., Israel, M. A. & Liotta, L. A. (W.B. Saunders, Baltimore)
34. Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.-H., Westermark, B. & Nister, M. (1992). Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52, 3313-3219.
35. Powel, M. (1999). Clinical review. Recent advances in neurosurgery. *Br Med J* 318, 35-38.
36. Schacker, G. (1998). Neurochirurgische Therapie der malignen Gliome. *Onkologe* 4, 599-607.
37. Kortmann, R., Becker, G., Köhl, J. & Bamberg, M. (1998). Strahlentherapie bei malignen

Gliomen.Onkologe 4, 608-17.

38. Cokgor (1999). Chemotherapy for adults with malignant glioma.Cancer-Invest. 17, 264-72.
39. Sawaya, R. (1999). Extent of resection in malignant gliomas: a critical summary.J-Neurooncol. 42, 303-305.
40. Wood, J., Green, S. & Shapiro, W. (1988). The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the brain tumor cooperative group.J Clin Oncol 6, 338-43.
41. Black, K. & Pikul, B. (1999). Gliomas- Past,Present, and Future.Clin Neurosurg 45, 160-3.
42. Kreth, F., Warnke, P., Schermet, R. & Ostertag, C. (1993). Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme.J Neurosurg 78, 762-6.
43. Fetell, M., Grossman, S., Fisher, J., Erlanger, B., Rowinsky, E., Stockel, J. & Piantadosi, S. (1997). Preirradiation paclitaxel in glioblastoma multiforme: efficacy, pharmacology, and drug interactions. New Approaches to Brain Tumor Therapy.J-Clin-Oncol. 15, 3121-8.
44. Silvani, A., Salmaggi, A., Pozzi, A., Fariselli, L., Franzini, A. & Boiardi, A. (1995). Effectiveness of early chemotherapy treatment in anaplastic astrocytoma patients.Tumori 81, 424-8.
45. Saleman, M., Scholtz, H. & Kaplan, R. e. a. (1994). Long-term survival in patients with malignant astrocytoma.Neurosurgery 34, 213-219.
46. Fine, H., Dear, K. & Loeffler, J. e. a. (1993). Meta-aalysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults.Cancer 71, 2585-2597.

-
47. Huncharek, M. & Muscat, J. (1998). Treatment of recurrent high grade astrocytoma: results of a systemic review of 1415 patients. *Anticancer Res* 18, 1303-1312.
 48. Cairncross, J., Macdonald, D., Ludwin, S., Lee, D., Cascino, T. & al, B. e. (1994). Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. *J Clin Oncol* 12, 2013-21.
 49. Cairncross, J., Ueki, K., Zlatescu, M., Lisle, D., Finkelstein, D. & Hammond, R. e. a. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90, 1473-9.
 50. Hofer, S., Roelcke, U. & Herrmann, R. (1999). Neue Aspekte der interdisziplinären Therapie maligner Gliome des Erwachsenenalters. *Schweiz Med Wochenschr* 129, 1332-41.
 51. Avgeropoulos, N. & Batchelor, T. (1999). New Treatment Strategies for Malignant Gliomas. *The Oncologist* 4, 209-224.
 52. Schweigerer, L. (1995). Antiangiogenese: ein neues Konzept zur Therapie solider Malignome. *Med. Klin.* 90, 709-712.
 53. Fine (1995). Novel biologic therapies for malignant gliomas. *Neurologic Clinics* 13, 827-846.
 54. Saleh, M., Stacker, S. & Wilks, A. (1996). Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res* 56, 393-401.
 55. Izquierdo, M., Martin, V. & de Felipe, P. (1996). Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther* 3, 491-495.
 56. Ram, Z., Culver, K. & Oshiro, E. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral-

implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3, 1354-1361.

57. Puumalainen, A.-M., Valpalahti, M. & Ylä-Herttuala, S. (1998) in *Gene Therapy of Cancer*, ed. Walden, A. (Raven Press, New York), pp. 505-509.
58. Knauth, M., Forsting, M., Hartmann, M., Heiland, S., Balzer, T. & Sartor, K. (1996). MR enhancement of brain lesions: increased contrast dose compared with magnetization transfer. *Am J Neuroradiol* 17, 1853-1859.
59. Katada, H., Nakagawa, H. & Kuroda, C. (1998). Malignant glioma. Evaluation with 3D time-of-flight MR angiography. *Acta Radiologica* 39, 227-232.
60. Knauth, M., Wirtz, C. R., Tronnier, V. M., Staubert, A., Kunze, S. & Sartor, K. (1998). [Intraoperative magnetic resonance tomography for control of extent of neurosurgical operations]. *Radiologe* 38, 218-24.
61. Black, P., Moriarty, T., Alexander, E., Stieg, P., Woodard, E., Gleason, P. & Martin, C. e. a. (1997). Development and implementation of intraoperative magnetic resonance imaging and its neurosurgical applications. *Neurosurgery* 41, 831-842.
62. Baxter, L. T. & Jain, R. K. (1989). Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc-Res* 37, 77-104.
63. Baxter, L. T. & Jain, R. K. (1990). Transport of fluid and macromolecules in tumors. II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvasc-Res* 40, 246-63.
64. Baxter, L. T. & Jain, R. K. (1991). Transport of fluid and macromolecules in tumors. III. Role of binding and metabolism. *Microvasc-Res* 41, 5-23.
65. Jain, R. K. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer-Res*

- 47, 3039-51.
66. Curti, B. D., Urba, W. J., Alvord, W. G., Janik, J. E., Smith, J. W. d., Madara, K. & Longo, D. L. (1993). Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. *Cancer-Res* 53, 2204-7.
 67. Gutmann, R., Leunig, A., Leunig, M. & Feyh, J. (1993). [Importance of increased interstitial fluid pressure in therapy of malignant tumors of the head-neck area]. *Laryngorhinootologie* 72, 338-41.
 68. Mahfouz, A. E., Hamm, B. & Wolf, K. J. (1994). Peripheral washout: a sign of malignancy on dynamic gadolinium-enhanced MR images of focal liver lesions. *Radiology* 190, 49-52.
 69. Sherif, H., Mahfouz, A. E., Oellinger, H., Hadijuana, J., Blohmer, J. U., Taupitz, M., Felix, R. & Hamm, B. (1997). Peripheral washout sign on contrast enhanced mr images of the breast. *Radiology* 205, 209-213.
 70. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine* 3, 177-182.
 71. van den Hauwe, L., Parizel, P. M., Martin, J. J., Cras, P., De Deyn, P. & De Schepper, A. M. (1995). Postmortem MRI of the brain with neuropathological correlation. *Neuroradiology* 37, 343-9.
 72. Nagashima, G., Suzuki, R., Hokaku, H., Takahashi, N., Miyo, T., Asai, J., Nakagawa, N. & Fujimoto, T. (1999). Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surg Neurol* 51, 292-299.

-
73. Earnest, F., Kelly, P., Scheithauer, B., Kall, B., Cascino, T., Ehman, R., Forbes, G. & Axley, P. (1988). Cerebral Astrocytomas: Histopathologic Correlation of MR and CT Contrast Enhancement with Stereotactic Biopsy. *Radiology* 166, 823-827.
 74. Forsting, M., Reith, W., Hartmann, M. & Knauth, M. (1996). [High dosage administration of paramagnetic contrast media in diagnosis of focal brain lesions]. *Radiologe* 36, 101-6.
 75. Haustein, J., Laniado, M., Niendorf, H., Louton, T., Beck, W., Planitzer, J., Schöffel, M., Reiser, M., Kaiser, W., Schörner, W., Hierholzer, H., Traupe, H. & Hamm, B. (1993). Triple-dose versus standard-dose gadopentate dimeglumine: a randomized study in 199 patients. *Radiology* 186, 855-860.
 76. Barker, F., Chang, S. & Huhn, S. (1997). Age and the risk of anaplasia in magnetic resonance non-enhancing supratentorial cerebral tumors. *Cancer* 80, 936-941.
 77. Chamberlain, M., Murovic, J. & Levin, V. (1988). Absent of contrast enhancement on CT brain scans of patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurology* 38, 1371-1374.
 78. Scott, J., Forsyth, P., Rewcastle, N., Brasher, P. & Sevik, R. (2000) in 38th Annual Meeting of the American Society of Neuroradiology, Atlanta), pp. 190.
 79. Hacklander, T., Hofer, M., Paselk, C. & Modder, U. (1993). [Functional imaging of the brain using low dose gadolinium-DTPA and Turbo-FLASH sequences]. *Röfo-Fortschr-Geb-Röntgenstr-Neuen-Bildgeb-Verfahr* 158, 348-54.
 - 79a. Villringer, A., Rosen, B., Belliveau, J. (1988) Dynamic imaging with lanthanide chelates in normal brain: contrast due to magnetic susceptibility effects. *Magn Reson Med* 6, 164-174
 80. Brix, G., Schreiber, W., Hoffmann, U., Gückel, F., Hawinghorst, H. & Knopp, M. (1997). Methodische Ansätze zur quantitativen Beurteilung der Mikrozirkulation im Gewebe mit

der dynamischen Magnetresonanztomographie. *Radiologe* 37, 470-480.

81. Kuwatsaru, R., Shames, D., Muehler, A., Mintorovitch, V., Vexler, J., Mann, J., Cohn, F., Price, D., Huberty, J. & Brasch, R. (1993). Quantification of tissue plasma volume in the rat by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* 30, 76-81.
82. Cohen, F. M., Kuwatsuru, R., Shames, D. M., Neuder, M., Mann, J. S., Vexler, V., Rosenau, W. & Brasch, R. C. (1994). Contrast-enhanced magnetic resonance imaging estimation of altered capillary permeability in experimental mammary carcinomas after X-irradiation. *Invest Radiol* 29, 970-7.
83. Su, M. Y., Najafi, A. A. & Nalcioğlu, O. (1995). Regional comparison of tumor vascularity and permeability parameters measured by albumin-Gd-DTPA and Gd-DTPA. *Magn Reson Med* 34, 402-11
84. van Dijke, C. F., Brasch, R. C., Roberts, T. P., Weidner, N., Mathur, A., Shames, D. M., Mann, J. S., Demsar, F., Lang, P. & Schwickert, H. C. (1996). Mammary carcinoma model: correlation of macromolecular contrast-enhanced MR imaging characterizations of tumor microvasculature and histologic capillary density. *Radiology* 198, 813-8.
85. Aronen, H., Gazit, I., Louis, D., Buchbinder, B., Pardo, F., Weisskoff, R., Harsh, G., Cosgrove, G., Halpern, E. & Hochberg, F. (1994). Cerebral blood volume maps of gliomas: comparison with tumor grade and histologic findings. *Radiology* 191, 41-51.
86. Aronen, H. J., Glass, J., Pardo, F. S., Belliveau, J. W., Gruber, M. L., Buchbinder, B. R., Gazit, I. E., Linggood, R. M., Fischman, A. J., Rosen, B. R. & et al. (1995). Echo-planar MR cerebral blood volume mapping of gliomas. Clinical utility. *Acta Radiol* 36, 520-8.
87. Knopp, E., Cha, S., Johnson, G., Mazumdar, A., Golfinos, J., Zagzag, D. & Miller, D. e. a. (1999). Glial Neoplasms: Dynamic Contrast-enhanced T2*-weighted MR Imaging. *Radiology*

211, 791-798.

88. Bruening, R., Kwong, K. K., Vevea, M. J., Hochberg, F. H., Cher, L., Harsh, G. R. t., Niemi, P. T., Weisskoff, R. M. & Rosen, B. R. (1996). Echo-planar MR determination of relative cerebral blood volume in human brain tumors: T1 versus T2 weighting. *AJNR-Am-J-Neuroradiol* 17, 831-40.
89. Frouge, C., Guinebretiere, J.-M., Contesso, G., Di Paola, R. & Blery, M. (1994). Correlation between contrast enhancement in dynamic Magnetic Resonance Imaging of the Breast and tumor angiogenesis. *Investigative Radiology* 29, 1043-1049.
90. Wenz, R., Rempp, K., Heß, T., Debus, J., Brix, G., Engenhard, R., Knopp, M., van Kaick, G. & Wannenmacher, M. (1995). Effect of Radiation on Blood Volume in Low-Grade Astrocytomas and Normal Brain Tissue: Quantification with Dynamic Susceptibility Contrast MR Imaging. *AJR* 166, 187-193.
91. Bauer, W. R., Hiller, K. H., Roder, F., Rommel, E., Ertl, G. & Haase, A. (1996). Magnetization exchange in capillaries by microcirculation affects diffusion-controlled spin-relaxation: a model which describes the effect of perfusion on relaxation enhancement by intravascular contrast agents. *Magn Reson Med* 35, 43-55.
92. Wedeking, P., Eaton, S., Covell, D., Nair, S., Tweedle, M. & Eckelmann, W. (1990). Pharmacokinetic analysis of blood distribution of intravenously administered ¹⁵³Gd-labeled Gd(DTPA) and ^{99m}Tc(DTPA) in rats. *Magn Reson Imaging* 8, 567-575.
93. Brasch, R. (1991). Rationale and Applications for Macromolecular Gd-Based contrast Agents. *Magn Reson Med* 22, 282-287.
94. Schmiedl, U. P., Kenney, J. & Maravilla, K. R. (1991). MRI of blood-brain barrier permeability in astrocytic gliomas: application of small and large molecular weight contrast media. *Magn*

Reson Med 22, 288-92.

95. Kenney, J., Schmiedl, U., Maravilla, K., Starr, F., Graham, M., Spence, A. & Nelson, J. (1992). Measurement of Blood-Brain Barrier Permeability in a Tumor Model Using Magnetic Resonance Imaging with Gadolinium -DTPA. *Magnetic Resonance in Medicine* 27, 68-75.
- 95a. Detre, J., Leigh, J., Williams, D., Koretsky, A. (1992) Perfusion imaging. *Magn. Rson. Med.* 23, 37-45
96. Sugahara, T., Korogi, Y., Kochi, M., Ikushima, I., Shigematu, Y., Hirai, T., Okuda, T., Liang, L., Ge, Y., Komohara, Y., Ushio, Y. & Takahashi, M. (1999). Usefulness of Diffusion-Weighted MRI With Echo-Planar Technique in the Evaluation of Cellularity in Gliomas. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 9, 53-60.
97. Krabbe, K., Gideon, P., Wagn, P., Hansen, U., Thomsen, C. & Madsen, F. (1997). MR diffusion imaging of human intracranial tumours. *Neuroradiology* 39, 483-9.
98. Sorensen, G. (2000). Diffusion Imaging in the Adult: Brain and Spine. In *Advanced Imaging Symposium, Atlanta*, pp. 143-154.
99. Chenevert, T., McKeever, P. & Ross, B. (1997). Monitoring early response of experimental brain tumors to therapy using diffusion magnetic resonance imaging. *Clin-Cancer-Res* 3, 1457-1466.
100. Kwong, K., Belliveau, J. & Chesler, D. e. a. (1992). Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5675-5679.
101. Ogawa, S., Tank, D. & Menon, T. e. a. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl*

Acad Sci USA 89, 5951-5955.

102. Nitschke, M., Melchert, U., Hahn, C., Otto, V., Arnold, H., Herrmann, H., Nowak, G., Westphal, M. & Wessel, K. (1998). Preoperative functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) of the Motor System in Patients with Tumours in the Parietal Lobe. *Acta Neurochirur* 140, 1223-1229.
103. Kim, S., Ashe, J., Hendrich, K., Ellermann, J., Merkle, H., Ugurbil, K. & Georgopoulos, A. (1993). Functional magnetic resonance imaging of motor cortex: asymmetry and handedness. *Science* 261, 615-617.
104. Atlas, S. W., Howard, R. S. d., Maldjian, J., Alsop, D., Detre, J. A., Listerud, J., D'Esposito, M., Judy, K. D., Zager, E. & Stecker, M. (1996). Functional magnetic resonance imaging of regional brain activity in patients with intracerebral gliomas: findings and implications for clinical management. *Neurosurgery* 38, 329-38.
105. Gallen, C., Sobel, D., Waltz, T., Aung, M., Copeland, B., Schwartz, B., Hirschkoff, E. & Bloom, F. (1993). Noninvasive presurgical neuromagnetic mapping of somatosensory cortex. *Neurosurgery* 33, 260-268.
106. Turner, R., Jezzard, P. & Wen, H. e. a. (1993). Functional mapping of the human visual cortex at 4 and 1.5 Tesla using deoxygenation contrast EPI. *Magn Reson Med* 29, 277-279.
107. Jack, C., Thompson, R. & Butts, R. (1994). Sensory motor cortex: correlation of presurgical mapping with functional MR imaging and invasive cortical mapping. *Radiology* 190, 85-92.
108. Kahn, T., Schwabe, B., Bettag, M., Harth, T., Ulrich, F., Rassek, M., Schwarzmaier, H. & Mödder, U. (1996). Mapping of the Cortical Motor Hand Area with Functional MR Imaging and MR Imaging-guided Laser-induced Interstitial Thermotherapy of Brain Tumors. *Radiology*

200, 149-157.

109. Yousry, T., Schmid, U. & Jassoy, A. (1995). Topography of the cortical motor hand area: prospective study with functional MR imaging and direct motor mapping at surgery. *Radiology* 195, 23-29.
110. Yetkin, F., Mueller, W. & Morris, G. (1997). Functional MR activation correlated with intraoperative cortical mapping. *AJNR* 18, 1311-1315.
111. Bruhn, H., Frahm, J., Gyngell, M., Merboldt, K., Hänicke, W., Sauter, R. & Hamburger, C. (1989). Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy in vivo: initial experiments in patients with cerebral tumors. *Radiology* 172, 541-548.
112. Demaerel, P., Johannik, K., Van Hecke, P., Van Ongeval, C., Verellen, S., Marchal, G., Wilms, G., Plets, C., Goffin, J., Van Calenbergh, F. & et al. (1991). Localized 1H NMR spectroscopy in fifty cases of newly diagnosed intracranial tumors. *J Comput Assist Tomogr* 15, 67-76.
113. Preul, M. C., Caramanos, Z., Collins, D. L., Villemure, J. G., Leblanc, R., Olivier, A., Pokrupa, R. & Arnold, D. L. (1996). Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med* 2, 323-5.
114. Preul, M. C., Caramanos, Z., Leblanc, R., Villemure, J. G. & Arnold, D. L. (1998). Using pattern analysis of in vivo proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR Biomed* 11, 192-200.
115. Fulham, M. J., Bizzi, A., Dietz, M. J., Shih, H. H., Raman, R., Sobering, G. S., Frank, J. A., Dwyer, A. J., Alger, J. R. & Di Chiro, G. (1992). Mapping of brain tumor metabolites with proton MR spectroscopic imaging: clinical relevance. *Radiology* 185, 675-86.

116. Negendank, W. G., Sauter, R., Brown, T. R., Evelhoch, J. L., Falini, A., Gotsis, E. D., Heerschap, A., Kamada, K., Lee, B. C., Mengeot, M. M., Moser, E., Padavic Shaller, K. A., Sanders, J. A., Spraggins, T. A., Stillman, A. E., Terwey, B., Vogl, T. J., Wicklow, K. & Zimmerman, R. A. (1996). Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg* 84, 449-58.
117. Alger, J. R., Frank, J. A., Bizzi, A., Fulham, M. J., DeSouza, B. X., Duhaney, M. O., Inscoe, S. W., Black, J. L., van Zijl, P. C., Moonen, C. T. & et al. (1990). Metabolism of human gliomas: assessment with H-1 MR spectroscopy and F-18 fluorodeoxyglucose PET. *Radiology* 177, 633-41.
118. Bruhn, H., Frahm, J., Gyngell ML, M., KD, Hänicke, W., Sauter, R. & Hamburger, C. (1989). Cerebral metabolism in man after acute stroke: new observations using localized proton NMR spectroscopy. *Magn. Res. Med.* 9, 126-131.
119. Miller, B. (1991). A review of chemical issues in 1 H NMR spectroscopy: N-acetyl-L-aspartate, creatinine, and choline. *NMR Biomed* 4, 47-52.
120. Ott, D., Hennig, J. & Ernst, T. (1993). Human brain tumors: assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 186, 745-52.
121. Castillo, M., Kwok, L. & Mukherji, S. (1996). Clinical Applications of Proton MR Spectroscopy. *AJNR* 17, 1-15.
122. Sijens, P. E., Oudkerk, M., van Dijk, P., Levendag, P. C. & Vecht, C. J. (1998). 1H MR spectroscopy monitoring of changes in choline peak area and line shape after Gd-contrast administration. *Magn Reson Imaging* 16, 1273-80.
123. Tedeschi, G., Lundbom, N., Raman, R., Bonavita, S., Duyn, J. H., Alger, J. R. & Di Chiro, G. (1997). Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas:

- a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. *J Neurosurg* 87, 516-24.
124. Klein, J., Koppen, A., Loffelholz, K. & Schmitthenner, J. (1992). Uptake and metabolism of choline by rat brain after acute choline administration. *Journal of Neurochemistry* 58, 870-876.
 125. Luyten, P., Marien, A. & Heindel, W. (1990). Metabolic imaging of patients with intracranial tumors. ¹H MR spectroscopic imaging and PET. *Radiology* 176, 791-799.
 126. Gill, S., Thomas, D. & van Bruggen, N. (1990). Proton MRS of intracranial tumors: in vivo and in vitro studies. *J Comput Assist Tomogr* 14, 497-504.
 127. Remy, C., Arus, C., Ziegler, A., Lai, E. S., Moreno, A., Le Fur, Y. & Decorps, M. (1994). In vivo, ex vivo, and in vitro one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J Neurochem* 62, 166-79.
 128. Kuesel, A., Donnelly, S., Halliday, W., Sutherland, G. & IC, S. (1994). Mobile lipids and metabolic heterogeneity of brain tumors as detectable by ex vivo ¹H MR spectroscopy. *NMR Biomed* 7, 172-180.
 129. Ranjeva, J., Sabatier, J., Manelfe, C., Franconi, J. & Berry, I. (1996) In Fourth Scientific Meeting of the International Society of Magnetic Resonance, pp. 982.
 130. Segebarth, C. M., Baleriaux, D. F., Luyten, P. R. & den Hollander, J. A. (1990). Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors in vivo by ¹H NMR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med* 13, 62-76.
 131. Sabatier, J., Gilard, V., Malet Martino, M., Ranjeva, J. P., Terral, C., Breil, S., Delisle, M. B., Manelfe, C., Tremoulet, M. & Berry, I. (1999). Characterization of choline compounds with

- in vitro ^1H magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Invest Radiol* 34, 230-5.
132. Frahm, J., Bruhn, H., Hanicke, W., Merboldt, K. D., Mursch, K. & Markakis, E. (1991). Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors using short-echo time STEAM sequences. *J Comput Assist Tomogr* 15, 915-22.
 133. Sanders, J. (1995) In *Functional Brain Imaging*, eds. Orrison, W., Lewine, J., Sanders, J. & Harshorne, M. (Mosby, St. Louis), pp. 419-467.
 134. Kugel, H., Heindel, W., Ernestus, R., Bunke, J., Du Mesnil, R. & Friedmann, G. (1992). Human Brain Tumors: Spectral Patterns Detected With Localized ^1H MR Spectroscopy. *Radiology* 183, 701-709.
 135. Castillo, M., Green, C., Kwok, L., Smith, K., Wilson, D., Schiro, S. & Greenwood, R. (1995). Proton MR spectroscopy in patients with neurofibromatosis type 1: evaluation of hamartomas and clinical correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 16, 141-7.
 136. Cheng, L., Chang, I., Louis, D. & Gonzalez, R. (1998). Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact brain tumor specimens. *Cancer Res* 58, 1865-1872.
 137. Norfray, J., Tomita, T. & Byrd, S. (1999). Clinical impact of MR spectroscopy when MR imaging is indeterminate for pediatric brain tumors. *AJR Am J Roentgenol* 173, 119-125.
 138. Nelson, S., Huhn, S., Vigneron, D., Day, M., Wald, L. & Prados, M. (1997). Volume MRI and MRSI techniques for the quantitation of treatment response in brain tumors: presentation of a detailed case study. *J Magn Reson Imag* 76, 1146-1152.
 139. Poptani, H., Kaartinen, J., Gupta, R. K., Niemitz, M., Hiltunen, Y. & Kauppinen, R. A. (1999).

- Diagnostic assessment of brain tumours and non-neoplastic brain disorders in vivo using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 343-9.
140. Di Chiro, G., Brooks, R. A., Patronas, N. J., Bairamian, D., Kornblith, P. L., Smith, B. H., Mansi, L. & Barker, J. (1984). Issues in the in vivo measurement of glucose metabolism of human central nervous system tumors. *Ann Neurol* 15 Suppl, 138-46.
141. Patronas, N. J., Di Chiro, G., Kufta, C., Bairamian, D., Kornblith, P. L., Simon, R. & Larson, S. M. (1985). Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. *J Neurosurg* 62, 816-22.
142. Doyle, W., Budinger, T., Valk, P., Levin, V. & Gutin, P. (1987). Differentiation of cerebral radiation necrosis from tumor recurrence by (18F) FDG and Rb-82 PET. *J Comput Assist Tomogr* 11, 563-570.
143. Kletter, K. & Becherer, A. (1999). FDG-PET in der Onkologie. *Radiologe* 39, 600-609.
144. Ogawa, T., Inugami, A., Hatazawa, J., Kanno, I., Murakami, M., Yasui, N., Mineura, K. & Uemura, K. (1996). Clinical positron emission tomography for brain tumors: comparison of fludeoxyglucose F 18 and L-methyl-11C-methionine. *AJNR Am J Neuroradiol* 17, 345-53.
145. Herholz, K., Holzer, T., Bauer, B., Schroder, R., Voges, J., Ernestus, R. I., Mendoza, G., Weber Luxenburger, G., Lottgen, J., Thiel, A., Wienhard, K. & Heiss, W. D. (1998). 11C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology* 50, 1316-22.
146. Derlon, J. M., Bourdet, C., Bustany, P., Chatel, M., Theron, J., Darcel, F. & Syrota, A. (1989). [11C]L-methionine uptake in gliomas. *Neurosurgery* 25, 720-8.
147. Tyler, J. L., Diksic, M., Villemure, J. G., Evans, A. C., Meyer, E., Yamamoto, Y. L. & Feindel,

- W. (1987). Metabolic and hemodynamic evaluation of gliomas using positron emission tomography. *J Nucl Med* 28, 1123-33.
148. Janus, T., Kim, E. & Tilbury, R. (1993). Use of 18 F fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with primary malignant brain tumors. *Ann Neurol* 33, 540-548.
149. DiChiro, G., DeLaPaz, R., Brooks, R., Sokoloff, L., Kornblith, P., Smith, B., J, Kufta, C., Kessler, R., Johnston, G., Manning, R. & Wolf, A. (1982). Glucose utilization of cerebral gliomas measured by 18 F fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 32, 1323-1329.
150. Alavi, J. B., Alavi, A., Chawluk, J., Kushner, M., Powe, J., Hickey, W. & Reivich, M. (1988). Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. *Cancer* 62, 1074-8.
151. Barker, F. G., 2nd, Chang, S. M., Valk, P. E., Pounds, T. R. & Prados, M. D. (1997). 18-Fluorodeoxyglucose uptake and survival of patients with suspected recurrent malignant glioma. *Cancer* 79, 115-26.
152. Olivero, W. C., Dulebohn, S. C. & Lister, J. R. (1995). The use of PET in evaluating patients with primary brain tumours: is it useful? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58, 250-2.
153. Valk, P. E., Budinger, T. F., Levin, V. A., Silver, P., Gutin, P. H. & Doyle, W. K. (1988). PET of malignant cerebral tumors after interstitial brachytherapy. Demonstration of metabolic activity and correlation with clinical outcome. *J Neurosurg* 69, 830-8.
154. Delbeke, D. (1999). Oncological applications of FDG PET imaging: brain tumors, colorectal cancer, lymphoma and melanoma. *J Nucl Med* 40, 591-603.
155. Maciunas, R. J., Kessler, R. M., Maurer, C., Mandava, V., Watt, G. & Smith, G. (1992).

- Positron emission tomography imaging-directed stereotactic neurosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg* 58, 134-40.
156. Levivier, M., Goldman, S., Bidaut, L., Luxen, A. & Stanus, E. (1992). Positron emission tomography-guided stereotactic brain biopsy. *Neurosurgery* 31, 1992.
157. Eary, J., Mankoff, D., Spence, A., Berger, M., Olshen, A., Link, J., Sullivan, F. & Krohn, K. (1999). 2-C-11 Thymidine Imaging of malignant brain tumors. *Cancer Research* 59, 615-621.
158. Livingston, R. & Hart, J. (1977). The clinical applications of cell kinetics in cancer therapy. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 17, 529-543.
159. Tamura, M., Shibasaki, T., Zama, A., Kurihara, H., Horikoshi, S., Ono, N., Oriuchi, N. & Hirano, T. (1998). Assessment of malignancy of glioma by positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose and single photon emission computed tomography with thallium-201 chloride. *Neuroradiology* 40, 210-5.
160. Kety, S. & Schmidt, C. (1948). The nitrous oxide method for quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure, and normal values. *J Clin Invest* 27, 476-483.
161. Meyer, J., Hayman, L., Amano, T., Nakajima, S., Shaw, T., Lauzon, T. & Derman, S. (1981). Mapping of local blood flow of human brain by CT scanning during stable xenon inhalation. *Stroke* 12, 426-436.
162. Yonas, H., Gur, D., Johnson, D. & Latchaw, R. (1991) In *MR and CT imaging of the head, neck and spine*, ed. Latchaw, R. (Mosby, St. Louis), pp. 109-128.
163. Nakamura, O., Segawa, H., Tanaka, H., Yoshimasu, N., Nagai, M. & Takaura, K. (1987).

rCBF in brain tumors as measured by Xenon enhanced CT. *Neurol Res* 9, 24-29.

164. Nakagawa, T., Tanaka, R., Takeuchi, S. & Takeda, N. (1998). Haemodynamic evaluation of cerebral gliomas using XeCT. *Acta Neurochir Wien* 140, 223-33.
165. Nasel, C., Rossler, K., Heimberger, K., Gorzer, H., Lassmann, H. & Schindler, E. (1997). Tumour blood flow and partition coefficients: correlation with grade of cerebral gliomas using xenon-enhanced computed tomography. *Neuroradiology* 39, 627-32.
166. Nasel, C. & Schindler, E. (1998). [Xenon-CT and perfusion MRI in the diagnosis of cerebral gliomas]. *Radiologe* 38, 930-4.
167. Blasberg, R., Molnar, P., Horowitz, M., Kornbluth, P., Pleasants, R. & Fenstermacher, J. (1983). Regional blood flow in RT-9 brain tumors. *J Neurosurg* 58, 863-873.
168. Groothuis, D., Pasternak, J., Fischer, J., Blasberg, R., Bigner, D. & Vick, N. (1983). Regional measurements of blood flow in experimental RG-2 rat gliomas. *Cancer Res* 43, 3362-3367.
169. Ito, M., Lammertsma, A., Wise, R., Bernadi, S., Fackowiak, R. & Heather, J. (1982). Measurement of regional cerebral blood flow and Oxygen utilization in patients with cerebral tumors using ^{15}O and positron emission tomography: analytical techniques and preliminary results. *Neuroradiology* , 63-74.
170. Endo, H., Larsen, B. & Lassen, N. (1977). Regional cerebral blood flow alterations remote from the site of intracranial tumors. *J Neurosurg* 47, 271-281.
171. Wise, R., Thomas, D., Lammertsma, A. & Rhodes, C. (1984). PET scanning of human brain tumors. *Progr Exp Tumor Res* 27, 154-169.
172. Alavin, J., Alavin, A., Chawluc, J., Kushner, M. & Powe, J. (1988). PET in patients with

- glioma: A predictor of prognosis. *Cancer* 62, 1074-1078.
173. Brooks, D., Beaney, R. & Thomas, D. (1986). The role of positron emission tomography in the study of cerebral tumors. *Sem Oncol* 13, 83-93.
 174. Touho, H., Karasawa, J., Shishido, H., Yamada, K. & Shibamoto, K. (1991). Cerebral blood flow measurements using stable xenon CT with very short inhalation times. *Neurol Med Chir Tokyo* 31, 77-81.
 175. Glass, J., Hochberg, F., Gruber, M., Louis, D. & Smith, D. (1992). The treatment of oligodendrogliomas and mixed oligodendroglioma-astrocytomas with PVC chemotherapy. *J Neurosurg.* 76, 741-745.
 176. Bloch, F., Hansen, W. & Packard, M. (1946). Nuclear induction. *Phys. Rev.* 69, 474-485.
 177. Solomon, I. (1955). Relaxation processes in a system of two spins. *Physiol. Rev.* 99, 559-561.
 178. Bloembergen, N. (1957). Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *J Chem Phys* 27, 572-573.
 179. Enochs, W. & Weissleder, R. (1996) in *MRI: clinical magnetic resonance imaging*, eds. Edelman, R., Hesselink, J. & Zlatkin, M. (Saunders, Philadelphia), pp. 192-220.
 180. Laniado, M. & Kopp, A. (1997). Gegenwärtiger Stand der klinischen Entwicklung von MR-Kontrastmitteln. *Röfo. Fortschr. Röntgenstr.* 167, 541-550.
 181. Kucharczyk, J., Roberts, T., Moseley, M. & Watson, A. (1993). Contrast-enhanced perfusion-sensitive MR imaging in the diagnosis of cerebrovascular disorders. *JMRI* 3, 241-245.

-
182. Widder, D., Greif, W., Eidler, K., Edelman, R. & Brady, T. (1987). Magnetite albumin microspheres: a new MR contrast material. *AJR* 148, 399-404.
 183. Carr, H. & Purcell, E. (1954). Effect of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys Rev* 94, 630-637.
 184. Majumdar, S., Zoghbi, S., Pope, C. & Gore, J. (1989). A quantitative study of relaxation rate enhancement produced by iron oxide particles in polyacrylamide gels and tissue. *Magn Reson Med* 9, 185-202.
 185. Rozenman, Y., Zou, X. M. & Kantor, H. L. (1990). Cardiovascular MR imaging with iron oxide particles: utility of a superparamagnetic contrast agent and the role of diffusion in signal loss. *Radiology* 175, 655-9.
 186. Fahlvik, A. K., Holtz, E., Leander, P., Schroder, U. & Klaveness, J. (1990). Magnetic starch microspheres, efficacy and elimination. A new organ-specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 25, 113-20.
 187. Josephson, L., Lewis, J., Jacobs, P., Hahn, P. & Stark, D. (1988). The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Mag Res Imag* 6, 647-653.
 188. Pouliquen, D., Le Jeune, J. J., Perdrisot, R., Ermias, A. & Jallet, P. (1991). Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magn Reson Imaging* 9, 275-83.
 189. Stark, D., Weissleder, R. & Elizondo, G. (1988). Superparamagnetic iron oxide: Clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 168, 297-301.
 190. Wolf, G., Burnett, K., Goldstein, E. & Joseph, P. (1985). Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Magnetic Resonance Annual* , 231-266.

-
191. Ohghushi, M., Nagayama, K. & Wada, A. (1978). Dextran magnetite: a new relaxation agent and its application to T2 measurements in gel systems. *J Mag Res* 29, 599-601.
 192. Weissleder, R. (1991). Target-specific superparamagnetic MR contrast agents. *Magn Reson Med* 22, 209-15.
 193. Weissleder, R., Stark, D., Engelstad, B., Bacon, B., Compton, C., White, D., Jacobs, P. & Lewis, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR* 152, 167-173.
 194. Kawamura, Y., Endo, K., Watanabe, Y. & al, e. (1990). Use of magnetite particles as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 174, 357-360.
 195. Reimer, P., Rummeny, E. J., Daldrup, H. E., Balzer, T., Tombach, B., Berns, T. & Peters, P. E. (1995). Clinical results with Resovist: a phase 2 clinical trial. *Radiology* 195, 489-96.
 196. Hamm, B., Staks, T., Taupitz, M., Maibauer, R., Speidel, A., Huppertz, A., Frenzel, T., Lawaczeck, R., Wolf, K. J. & Lange, L. (1994). Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *J Magn Reson Imaging* 4, 659-68.
 197. Kopp, A. F., Laniado, M., Dammann, F., Stern, W., Gronewaller, E., Balzer, T., Schimpfky, C. & Claussen, C. D. (1997). MR imaging of the liver with Resovist: safety, efficacy, and pharmacodynamic properties. *Radiology* 204, 749-56.
 198. Weissleder, R., Hahn, P., Stark, G., Elizondo, S., Todd, L., Wittenberg, J. & Ferruci, J. (1988). Superparamagnetic iron oxide: enhanced detection of focal splenic tumors with MR imaging. *Radiology* 169, 399-403.
 199. Anzai, Y. & Prince, M. R. (1997). Iron oxide-enhanced MR lymphography: the evaluation of

- cervical lymph node metastases in head and neck cancer. *J Magn Reson Imaging* 7, 75-81.
200. Johnson, W. K., Stoupis, C., Torres, G. M., Rosenberg, E. B. & Ros, P. R. (1996). Superparamagnetic iron oxide (SPIO) as an oral contrast agent in gastrointestinal (GI) magnetic resonance imaging (MRI): comparison with state-of-the-art computed tomography (CT). *Magn Reson Imaging* 14, 43-9.
201. Schoepf, U., Marecos, E. M., Melder, R. J., Jain, R. K. & Weissleder, R. (1998). Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques* 24, 642-6, 648-51.
202. Weissleder, R., Cheng, H. C., Bogdanova, A. & Bogdanov, A., Jr. (1997). Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 7, 258-63.
203. Yeh, T. C., Zhang, W., Ildstad, S. T. & Ho, C. (1993). Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents. *Magn Reson Med* 30, 617-25.
204. Yeh, T. C., Zhang, W., Ildstad, S. T. & Ho, C. (1995). In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med* 33, 200-8.
205. Moore, A., Weissleder, R. & Bogdanov, A., Jr. (1997). Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging* 7, 1140-5.
206. Remsen, L. G., McCormick, C. I., Roman Goldstein, S., Nilaver, G., Weissleder, R., Bogdanov, A., Hellstrom, I., Kroll, R. A. & Neuwelt, E. A. (1996). MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrystalline iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 17, 411-8.

-
207. Kresse, M., Wagner, S., Pfefferer, D., Lawaczeck, R., Elste, V. & Semmler, W. (1998). Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways. *Magn Reson Med* 40, 236-42.
 208. Moore, A., Basilion, J. P., Chiocca, E. A. & Weissleder, R. (1998). Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging. *Biochim Biophys Acta* 1402, 239-49.
 209. Josephson, L., Tung, C. H., Moore, A. & Weissleder, R. (1999). High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem* 10, 186-91.
 210. Shen, T., Weissleder, R., Papisov, M., Bogdanov, A., Jr. & Brady, T. J. (1993). Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 29, 599-604.
 211. Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C., Bengel, H. & Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 175, 489-493.
 212. Josephson, L., Groman, E. V., Menz, E., Lewis, J. M. & Bengel, H. (1990). A functionalized superparamagnetic iron oxide colloid as a receptor directed MR contrast agent. *Magn Reson Imaging* 8, 637-46.
 213. Miller, J. & Zahniser, N. (1987). The use of ^{14}C -labeled tissue paste standard for the calibration of ^{125}I -labeled ligands in quantitative autoradiography. *Neuroscience Letters* 81, 345-350.
 214. Zimmer, C., Weissleder, R., O'Connor, D., Poss, K. & Brady, T. (1995) In Proceedings of the 81st Scientific Assembly and Annual Meeting of the Radiological Society of North America, Chicago, 197

-
215. Neuwelt, E. (1989) Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation: Clinical Aspects (Plenum Press, New York).
 216. Neuwelt, E., Howieson, J., Frenkel, E., Specht, D., Weigel, R., Buchan, C. & Hill, S. (1986). Therapeutic efficacy of multiagent chemotherapy with drug delivery enhancement by blood-brain barrier modification in glioblastoma. *Neurosurgery* 19, 573-582.
 217. Neuwelt, E., Barnett, P., Ramsey, F., Hellstroem, I., Hellstroem, K. & McCormick, C. (1993). Dexamethasone decreases the delivery of tumor-specific monoclonal antibody to both intracerebral and subcutaneous tumor xenografts. *Neurosurgery* 33, 478-484.
 218. Jensen, M., Finsen, B. & Zimmer, J. (1997). Morphological and Immunophenotypic Microglial Changes in the Denervated Fascia Dentata of Adult Rats: Correlation with Blood-Brain Barrier Damage and Astroglial Reactions. *Experimental Neurology* 143, 103-116.
 219. Schulze, E., Ferrucci, J. T., Poss, K., Lapointe, L., Bogdanova, A. & Weissleder, R. (1995). Cellular Uptake and Trafficking Of a Prototypical Magnetic Iron Oxide Label In Vitro. *Investigative Radiology* 30 (10), 604-610.
 220. Connor, J. & Benkovic, S. (1992). Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann Neurol* 32, S51-S61.
 221. Benda, J., Lightbody, J., Sato G, Levine, L. & Sweet, W. (1969). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-371.
 222. Weizsaecker, M., Deen, D., Rosenblum, M., Hoshino, T., Gutin, P. & Barker, M. (1981). The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J Neurol* 224, 183-192.
 223. Koeppen, A. & Borke, R. (1991). Experimental superficial siderosis of the central nervous system. 1. Morphological obseervations. *J Neuropath Expr Neurol* 50, 579-594.

-
224. Turner, D., Snyder, E. & Cepko, C. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-845.
225. Zimmer, C., Weissleder, R., O'Connor, D., LaPointe, L., Brady, T. J. & Enochs, W. S. (1995). Cerebral iron oxide distribution: in vivo mapping with MR imaging. *Radiology* 196, 521-7.
- 225a. Zimmer, C., Weissleder, R., Poss, K., Bogdanova, A., Wright, S.C. & Enochs, W. S. (1995). MR Imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiology* 197, 533-8.
226. Noske, W., Lentzen, H., Lange, K. & Keller, K. (1982). Phagocytotic activity of glial cells in culture. *Exp Cell Res* 142, 437-445.
227. Bjerknes, R., Bjerkvig, R. & Laerum, O. (1987). Phagocytic capacity of normal and malignant rat glial cells in culture. *JNCI* 78, 279-294.
228. Rossi, M., Hughes, J., Esiri, M., Coakham, H. & Brownell, D. (1987). Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol Berl* 74, 269-277.
229. Wood, G. & Morantz, R. (1979). Immunohistologic evaluation of the lymphoreticular infiltration of human central nervous system tumors. *J Natl Cancer Inst* 62, 485-491.
230. Morimura, T., Neuchrist, C., Kitz, k., Budka, H. & SCHeiner, O. (1990). Monocyte subpopulations in human gliomas: expression pf Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol Ber* 80, 287-294.
231. Roggendorf, W., Strupp, S. & W, P. (1996). Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol Berl* 92, 288-293.
232. Morioka, T., Baba, T., Black, K. & Streit, W. (1992). Response of microglial cells to

experimental rat glioma. *Glia* 6, 75-79.

233. Fleige, G., Nolte, C., Synowitz, M., Seeberger, F., Kettenmann, H. & Zimmer, C. (2000). MR Imaging of activated microglia in experimental gliomas. (submitted to *Neuroimaging*).
234. Moore, A., Marecos, E., Bogdanov, A. & Weissleder, R. (2000). Tumoral Distribution of Long-circulating Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles in a Rodent Model. *Radiology* 214, 568-574.
235. Moffett, J., Els, T., Espey, M., Walter, S., Streit, W. & Namboodiri, M. (1997). Quinolate immunoreactivity in experimental rat brain tumors is present in macrophages but not in astrocytes. *Exp Neurol* 144, 287-301.
236. Kettenmann, H. (1996). Beyond the neuronal circuitry. *Trends Neurosci* 19, 305-306.
237. Streit, W. & Graeber, M. (1993). Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7, 68-74.
238. Badie, B., Schartner, J., Klaver, J. & Vorpahl, J. (1999). In vitro modulation of microglia motility by glioma cells is mediated by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Neurosurgery* 44, 1077-1082.
239. Flugel, A., Labeur, M., Grasbon-Frodl, E., Kreutzberg, G. & Graeber, M. (1999). Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int J Dev Neurosci* 17, 547-556.
240. Wagner, S., Czub, S., Greif, M., Vince, G., Suss, N., Kerkau, S., P, R., Roggendorf, W., Roosen, K. & Tonn, J. (1999). Microglia/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 82, 12-16.
241. Pulfer, S., Ciccotto, S. & Gallo, J. (1999). Distribution of small magnetic particles in brain

- tumor-bearing rats. *Journal of Neuro-Oncology* 41, 99-105.
242. Schulze, E. & Kirschner, M. (1988). New features of microtubule behavior. *Nature* 334, 356-359.
243. Zimmer, C. & Weissleder, R. (1995). Phagozytose und Metabolismus von Eisenoxiden. Untersuchungen an experimentellen Hirntumoren. Kurt Decker-Preis der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie.
244. Bogdanova, A., Nossiff, N., Bogdanov, A., Brady, T. & Weissleder, R. (1994) in Proceedings of the 2nd annual meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, San Francisco), pp. 931.
245. Bogdanov, A., Papisov, M., Weissleder, R., Shen, T. & Brady, T. (1992) in Proceedings of the 11th annual scientific meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, Berlin), pp. 864.
246. Chang, H. (1991). Anterograde Transport of Lucifer Yellow-Dextran Conjugate. *Brain Res Bull* 26, 813.
247. Duncan, J. & Welch, M. (1993). Intracellular Metabolism of Indium-111-DTPA-Labeled Receptor Targeted Proteins. *J Nucl Med* 34, 1728-1737.
248. Sands, H. (1990). Experimental Studies of Radioimmunodetection of Cancer: An Overview. *Cancer Res Suppl.* 50, 809-813.
249. Weissleder, R. & Papisov, M. (1992). Pharmaceutical Iron Oxides for MR Imaging. *Reviews of Magnetic Resonance in Medicine* 4, 1-20.
250. Scharf, J., Boviatsis, E., Fleet, C., Breakefield, X. & Chiocca, E. (1994). Genetically modified

- rat 9L gliosarcoma cells facilitate detection of infiltrating tumor cells in a rat model of brain neoplasms. *Transgenics* 1, 219-224.
251. Zimmer, C., Wright, S. C., Engelhardt, R. T., Johnson, A. J., Kramm, C., Breakfield, X. O. & Weissleder, R. (1997). Tumor cell endocytosis imaging facilitates delineation of invasive glioma-brain interface. *Experimental Neurology* 143, 61-69.
252. Egelhof, T., Delbeck, N., Hartmann, M., Roth, S. U., Elste, V., Heiland, S. & Sartor, K. (1998). [Can superparamagnetic contrast media improve MRI-tomographic images of experimental gliomas?]. *Radiologe* 38, 943-7.
253. Barth, R. (1998). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 36, 91-102.
254. Inamura, T. & Black, K. (1994). Bradykinin Selectively Opens Blood-Tumor Barrier in Experimental Brain Tumors. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 14, 862-870.
255. Neuwelt, E., Barnett, P. & McCormick, C. (1985). Osmotic blood-brain barrier modification: monoclonal antibody, albumin, and methotrexate delivery to cerebrospinal fluid and brain. *Neurosurgery* 17, 419-423.
256. Tomiwa, K., Hazama, F. & Mikawa, H. (1983). Neurotoxicity of vincristine after the osmotic opening of the blood-brain barrier. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9, 345-354.
257. Neuwelt, E., Hill, S. & Frenkel, E. (1984). Osmotic blood-brain barrier modification and combination chemotherapy: concurrent tumor regression in areas of barrier opening and progression in brain regions distant to barrier opening. *Neurosurgery* 15, 362-366.
258. Barnett, P., Roman-Goldstein, S., Ramsey, F., McCormick, C., Sexton, G., Szumowski, J. & Neuwelt, E. (1995). Differential permeability and quantitative MR imaging of a human lung

- carcinoma brain xenograft in the nude rat. *Am J Pathol* 146, 436-449.
259. Neuwelt, E. (1989) *Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation* (Plenum Press, New York).
260. Millay, R., Klein, M., Shults, W., Dahlborg, S. & EA, N. (1986). Maculopathy associated with combination chemotherapy and osmotic opening of the blood brain barrier. *Am J Ophthalmol* 102, 626-632.
261. Rainov, N., Zimmer, C., Chase, M., Kramm, C., Chiocca, E., Weissleder, R. & Breakfield, X. (1995). Selective uptake of viral and monocrySTALLine particles delivered intraarterially to experimental brain neoplasms. *Human Gene Therapy* 6, 1543-1552.
262. Bartus, R., Elliot, P., Dean, R., Hayward, N., Nagle, T., Huff, M., Snodgrass, P. & Blunt, D. (1996). Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7. *Exp Neurol* 142, 14-28.
263. LeMay, D., Kittaka, M., Gordon, E., Gray, B., Stins, M., McComb, J., Jovanovic, S., Trabizi, P., Weiss, M., Bartus, R., Anderson, W. & Zlokovic, B. (1998). Intravenous RMP-7 increases delivery of ganciclovir into rat brain tumors and enhances the effects of herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy. *Hum Gene Ther* 9, 989-995.
264. Nomura, T., Inamura, T. & Black, K. (1994). Intracarotid infusion of bradykinin selectives increases blood-tumor permeability in 9L and C6 brain tumors. *Brain Res* 659, 62-66.
265. Nakano, S., Matsukado, K. & Black, K. (1996). Increased brain tumor microvessel permeability after intracarotid bradykinin infusion is mediated by nitric oxide. *Cancer Res* 56, 4027-4031.
266. Kroll, R. A., Pagel, M. A., Muldoon, L. L., Roman Goldstein, S., Fiamengo, S. A. & Neuwelt,

- E. A. (1998). Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery* 43, 879-86.
267. Gatter, K. C., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woolston, R.-E. & Mason, D. Y. (1983). Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J. Clin. Path.* 36, 539-545.
268. Faulk, W., Hsi, B. & Stevens, P. (1980). Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* , 390-392.
269. Friden, P. (1994). Receptor-mediated transport of therapeutics across the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 35, 294-298.
270. Kresse, M. (1994) Thesis im Fachbereich Pharmazie (Freie Universität Berlin, Berlin).
271. Hsu, S., Raine, L. & Fanger, H. (1981). The use of anti-avidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *American Journal of Clinical Pathology* 75, 816-821.
272. Fassel, V. (1979). Simultaneous or Sequential Determination of the Elements at All Concentration Levels - the Renaissance of an Old Approach. *Anal Chem* 51, 1290-1308.
273. Andrase, E., Nadasdi, J., Molnar, Z., Bezur, L. & Ernyei, L. (1990) , ed. Schrauzer, G. (The Humana Press, New York), pp. 691-698.
274. Jefferies, W., Brandon, M., Hunt, S., Williams, A., Gatter, K. & Mason, D. (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312, 162-163.
275. Risau, W., Hallmann, R. & Albrecht, U. (1986). Differentiation-dependent expression of

- proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier. *Dev Biol* 117, 537-45.
276. Pardridge, W. M., Boado, R. J. & Kang, Y. S. (1995). Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5592-6.
277. Pardridge, W. M., Eisenberg, J. & Yang, J. (1987). Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism* 36, 892-5.
278. Fishman, J. B., Rubin, J. B., Handrahan, J. V., Connor, J. R. & Fine, R. E. (1987). Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 18, 299-304.
279. Aisen, P. (1980) In *Iron in biochemistry and medicine*, eds. Jacobs, A. & Werwood (Academic Press, London).
280. Trowbridge, I. & Newman, R. (1984) in *Receptors and Recognition*, ed. Greaves (Chapman and Hall, London-New York), Vol. 17, pp. 235-261.
281. Hansen, S., Sandvig, K. & van Deurs, B. (1992). Internalization efficiency of the transferrin receptor. *Exp Cell Research* 199, 19-28.
282. Friden, P. M. (1994). Receptor-mediated transport of therapeutics across the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 35, 294-8.
283. Bogdanov, A. A., Jr., Weissleder, R., Frank, H. W., Bogdanova, A. V., Nossif, N., Schaffer, B. K., Tsai, E., Papisov, M. I. & Brady, T. J. (1993). A new macromolecule as a contrast agent for MR angiography: preparation, properties, and animal studies. *Radiology* 187, 701-6.

-
284. Weinmann, H.-J., Brasch, R., Press, W.-R., Wesbey, G. (1984). Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent. *AJR* 142, 619-624.
285. Donahue, K. M., Weisskoff, R. M., Parmelee, D. J., Callahan, R. J., Wilkinson, R. A., Mandeville, J. B. & Rosen, B. R. (1995). Dynamic Gd-DTPA enhanced MRI measurement of tissue cell volume fraction. *Magn-Reson-Med* 34, 423-32.
286. Lawaczeck, R., Bauer, H., Frenzel, T., Hasegawa, M., Ito, Y., Kito, K., Miwa, N., Tsutsui, H., Vogler, H. & Weinmann, H. J. (1997). Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A. *Acta Radiol* 38, 584-97.
287. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-6.
288. Yung, W. (1997). A NCNSC phase II trial of thalidomide, an antiangiogenic agent, in patients with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 35(suppl 56), 206 a.
289. Kolles, H., Niedermayer, I. & Feiden, W. (1998). [Grading of astrocytomas and oligodendrogliomas]. *Pathologe* 19, 259-68.
290. Su, M. Y., Jao, J. C. & Nalcioğlu, O. (1994). Measurement of vascular volume fraction and blood-tissue permeability constants with a pharmacokinetic model: studies in rat muscle tumors with dynamic Gd-DTPA enhanced MRI. *Magn-Reson-Med* 32, 714-24.
291. Weissleder, R., Cheng, H. C., Marecos, E., Kwong, K. & Bogdanov, A., Jr. (1998). Non-invasive in vivo mapping of tumour vascular and interstitial volume fractions. *Eur J Cancer* 34, 1448-54.
292. Berchtenbreiter, C., Bruening, R., Wu, R., Penzkofer, H., Weber, J. & Reiser, M. (1999).

- Comparison of the Diagnostic Information in Relative Cerebral Blood Volume, Maximum Concentration, and Subtraction Signal Intensity Maps Based on Magnetic Resonance Imaging of Gliomas. *Investigative Radiology* 34, 75-81.
293. Brasch, R., Pham, C., Shames, D., Roberts, T., van Dijke, K., van Bruggen, N., Mann, J., Ostrowitzki, S. & Melnyk, O. (1997). Assessing tumor angiogenesis using macromolecular MR imaging contrast media. *J-Magn-Reson-Imaging* 7, 68-74.
294. Brasch, R., Shames, D., Cohen, F., Kuwatsuru, R., Neuder, M., Mann, J., Vexler, V., Muehler, A. & Rosenau, W. (1994). Quantification of Capillary Permeability to Macromolecular Magnetic Resonance Imaging Contrast Media in Experimental Mammary Adenocarcinomas. *Investigative Radiology* 29, S8-S11.
295. Dvorak, H., Nagy, J., Dvorak, J. & Dvorak, A. (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 33, 95-109.
296. Diekmann, C., Hofmann, B., Lobsien, D. & Luedemann, L. (1999) Quantitative Perfusionsmessungen von experimentellen Gliomen. *Med. Physik*, 259-260
297. Heuser, L. & Miller, F. (1986). Differential Macromolecular Leakage from the Vasculature of Tumors. *Cancer* 57, 461-464.
298. Reimer, P., Schuierer, G., Balzer, T. & Peters, P. E. (1995). Application of a superparamagnetic iron oxide (Resovist) for MR imaging of human cerebral blood volume. *Magn Reson Med* 34, 694-7.
299. Le Duc, G., Péoc'h, M., Remy, C., Charpy, O., Muller, R., Le Bas, J. & Decorps, M. (1999). Use of T2-Weighted Susceptibility Contrast MRI for Mapping the Blood Volume in the Glioma-Bearing Rat Brain. *Magn Reson Med* 42, 754-761.

-
300. Wenz, F., Rempp, K., Hess, T., Debus, J., Brix, G., Engenhart, R., Knopp, M. V., van Kaick, G. & Wannenmacher, M. (1996). Effect of radiation on blood volume in low-grade astrocytomas and normal brain tissue: quantification with dynamic susceptibility contrast MR imaging. *AJR-Am-J-Roentgenol* 166, 187-93.
 301. Schwickert, H. C., Stiskal, M., Roberts, T. P., van Dijke, C. F., Mann, J., Muhler, A., Shames, D. M., Demsar, F., Disston, A. & Brasch, R. C. (1996). Contrast-enhanced MR imaging assessment of tumor capillary permeability: effect of irradiation on delivery of chemotherapy. *Radiology* 198, 893-8.
 302. Feldmann, H. J., Sievers, K., Fuller, J., Molls, M. & Lohr, E. (1993). Evaluation of tumor blood perfusion by dynamic MRI and CT in patients undergoing thermoradiotherapy. *Eur-J-Radiol* 16, 224-9.
 303. Bruening, R., Wu, R., Yousry, T., Berchtenbreiter, C., Weber, J., Peller, M., Steiger, H. & Reiser, M. (1998). Regional relative blood volume MR Maps of Meningiomas before and after partial embolization. *Journal of Computer Assisted Tomography* 22, 104-110.
 304. Su, M., Wang, Z. & Nalcioğlu, O. (1999). Investigation of longitudinal vascular changes in control and chemotherapy-treated tumors to serve as therapeutic efficacy predictors. *J Magn Reson Imaging* 9, 128-137.

VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Arteria
ADC	„apparent diffusion coefficient“
ASL	„arterial spin labelling“
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHTS	Blut-Hirn-Tumor-Schranke
BCA	„bicinchoninic acid“
BHZ	Bluthalbwertszeit
CBF	cerebraler Blutfluss
CBV	cerebrales Blutvolumen
Cho	Cholin
CISS	„constructive interference in steady state“, Sequenz
cm	Zentimeter
Cr	Creatinin
CT	Computertomographie

d/ds	Tag/Tage
DAB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
DLS	Dynamische Laserlicht-Streuung
DMEM	„Dulbecco´s modified eagle medium“
dMRT	dynamische Magnetresonanztomographie
DWI	„diffusion weighted imaging“, Diffusionsbildgebung
EPI	„Echo planar Imaging“, echoplanare MRT
Fe	Eisen
FDG	Desoxyglucose
FKS	fötales Kälberserum
FLAIR	„fluid attenuated inversion recovery“, Sequenz
FLASH	„fast low angle shot“, Sequenz
FOV	„field of view“
FSE	„fast spin echo“, Sequenz

fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FW	Flipwinkel
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gd	Gadolinium
GRASS	„gradient-recalled acquisition in a steady state“, Sequenz
GRE	Gradienten-Echo, Sequenz
HE	Hämatoxylin Eosin
h/hrs	Stunde/Stunden
Hz	Hertz
HGG	„high grade glioma“
ICP-AES	„induced coupled plasma atomic emission spectroscopy“
Ins	Inositol
IR	Inversion Recovery
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KR	Kontrast-Rausch-Verhältnis
KM	Kontrastmittel
kV	Kilovolt
La	Laktat
LGG	„low grade glioma“
Li	Lipide
Magnitit	superparamagnetisches Eisenoxid mit „magnetartiger“ Kristallstruktur
mAs	Milli-Ampere-Sekunde
min	Minute
MION	„monocrystalline iron oxide nanoparticle“
ml	Milliliter
MI	Myoinositol
mm	Millimeter

mM	Millimol
mOsmol	Milliosmol
MPEG-PI	Methoxy Polyethylene Glycol-Poly-L-Lysine
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MW	Molekulargewicht
N	Nukleus
NAA	N-Acetylaspartat
nm	Nanometer
P	Permeabilität
PET	Positron Emissions Tomographie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD	Protonendichte
PDw	PD-gewichtet

PSD	Partikel-Größenverteilung
R	Relaxivität
RARE	Rapid acquisition with relaxation
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
rCBV	regionales zerebrales Blutvolumen
rCP	regionale kapilläre Permeabilität
RES	retikuloendoteliales System
RME	Rezeptor-vermittelte Endozytose
ROI	„region of interest“
rPT	regionale Permeabilität
rTBF	regionaler Tumorblutfluss
rTBV	regionales Tumorblutvolumen
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SE	Spin Echo, Sequenz

SI	Signalintensität
SPIO	„superparamagnetic iron oxides“
SPECT	„Single-Photon-Emissions-Computer-Tomography“
S/R	Signal-Rausch-Verhältnis
T1	longitudinale Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxationszeit)
T2	transversale Relaxationszeit (Spin-Spin Relaxationszeit)
T	Tessla
TBV	Tumorblutvolumen
TE	„time of echo“, Echozeit
TEM	Elektronenmikroskopie in Transmission
Tf	Transferrin
TIRM	„turbo inversion recovery magnitude“, Sequenz
TOF	„time of flight“, Sequenz
TK	Thymidin Kinase
TR	„time of repetition“, Repetitionszeit

TSE	Turbo-Spin-Echo, Sequenz
TSL	„tissue spin labeling“
USPIO	„ultrasmall superparamagnetic iron oxides“
UV	Ultraviolett
VVF	vaskuläre Volumenfraktion
WHO	World Health Organisation
Xe CT	Xenon Computer Tomography

VII. DANKSAGUNG

Herrn Prof. H. Traupe (Abteilung Neuroradiologie, Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen) gilt mein spezieller Dank. Er weckte in mir Neugier und Begeisterung für die Neuroradiologie.

Herrn Prof. R. Lehmann (Abteilung Neuroradiologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin) verdanke ich, zusammen mit Prof. Traupe, eine umfassende klinische Ausbildung in der Neuroradiologie.

Herrn Prof. B. Hamm (Institut für Radiologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin) gilt mein Dank dafür, dass er mir nach meiner Rückkehr aus den USA neben der Facharztausbildung die Möglichkeiten gab, eine eigene Arbeitsgruppe mit experimenteller Ausstattung innerhalb der Charité aufzubauen. Dadurch konnte ich kontinuierlich meine begonnenen Forschungsarbeiten in Deutschland fortsetzen.

Den Grundstein für die vorliegenden Arbeiten bildet die Zusammenarbeit mit R. Weissleder (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA). Sein fachlicher Rat und die Nutzungsmöglichkeit der gesamten Laborkapazität bot mir während meines zweijährigen Forschungsaufenthaltes in Boston nahezu optimale Bedingungen für meine Forschungsarbeit. Neben allen anderen Kollegen in Boston sei insbesondere Carter Wright gedankt, der mich in nächtlichen MR-Sitzungen und bei der histologischen Aufarbeitung der Gewebeuntersuchungen unterstützte.

Für den Zugang zu verschiedenen experimentellen Kontrastmitteln danke ich Herrn Prof. W. Semmler (Institut für Diagnostikforschung GmbH an der FU Berlin, jetzt DKFZ Heidelberg) und seinen Mitarbeitern Herrn Dr. M. Kresse und Frau Dr. B. Hofmann. Frau Hofmann war mir insbesondere bei den ICP-AES Messungen behilflich.

Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse zur Gliomangiogenese wurde gemeinsam mit meinen Dok-

toranden Frau C. Diekmann und Herrn D. Lobsien gewonnen. Die hier vorgestellten Teilergebnisse zur Bildgebung der Tumorangiogenese fließen auch in deren noch nicht abgeschlossene Promotionsarbeit „MR-Perfusionsmessungen an experimentellen Gliomen.“ bzw. „Korrelation von Histologie und in vivo MR-Bildgebung in der Darstellung der Gliomangiogenese“ ein.

Herrn Dr. G. Fleige aus der eigenen Arbeitsgruppe sei gedankt für die produktive Zusammenarbeit hinsichtlich der Makrophagen- und Mikroglia-Bildgebung innerhalb des letzten Jahres, ich freue mich auf weiteres.

Nicht zuletzt gebührt mein besonderer Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für ein zweijähriges Forschungsstipendium, welches mir ermöglichte von 1994 - 1996 an der Harvard Medical School im Massachusetts General Hospital in Boston (USA) zu arbeiten. Darüber hinaus wurde und wird ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse durch die DFG in einem Anschlussprojekt in Deutschland weiter gefördert („MR-Untersuchung des angiogenetischen Profils von experimentellen Gliomen vor und nach antiangiogenetischer Therapie“, Zi 477/2-2).